



**ROLE DE L'EXOENZYME S DE PSEUDOMONAS
AERUGINOSA DANS LA VIRULENCE
BACTERIENNE: ETUDE FONCTIONNELLE DU
DOMAINE GAP ET DE SES CIBLES SUR LA
REPONSE IMMUNITAIRE CHEZ DROSOPHILA
MELANOGASTER**

Amélie Avet-Rochex

► **To cite this version:**

Amélie Avet-Rochex. ROLE DE L'EXOENZYME S DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA DANS LA VIRULENCE BACTERIENNE: ETUDE FONCTIONNELLE DU DOMAINE GAP ET DE SES CIBLES SUR LA REPONSE IMMUNITAIRE CHEZ DROSOPHILA MELANOGASTER. Immunologie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT : . tel-00088218

HAL Id: tel-00088218

<https://theses.hal.science/tel-00088218>

Submitted on 31 Jul 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I

THESE

Présentée et soutenue publiquement par

Amélie AVET-ROCHEX

Le 3 octobre 2005

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : **Virologie, Microbiologie, Immunologie**

**ROLE DE L'EXOENZYME S DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DANS LA
VIRULENCE BACTERIENNE :
ETUDE FONCTIONNELLE DU DOMAINE GAP ET DE SES CIBLES SUR LA
REPONSE IMMUNITAIRE CHEZ *DROSOPHILA MELANOGASTER***

Composition du jury :

M. Hans GEISELMANN	<i>Professeur</i>	Président
Mme Marie MEISTER	<i>Docteur</i>	Rapporteur
M. Bruno LEMAITRE	<i>Docteur</i>	Rapporteur
M. Abdelaziz HEDDI	<i>Docteur</i>	Examineur
Mme Marie-Odile FAUVARQUE	<i>Docteur</i>	Directrice de thèse

Thèse préparée dans le laboratoire de Biochimie et Biophysique des systèmes intégrés
UMR 5092 CEA-CNRS-UJF
Dirigé par le Dr Michel SATRE
Département de Réponse et Dynamique Cellulaires
CEA-GRENOBLE

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I

THESE

Présentée et soutenue publiquement par

Amélie AVET-ROCHEX

Le 3 octobre 2005

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : **Virologie, Microbiologie, Immunologie**

**ROLE DE L'EXOENZYME S DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DANS LA
VIRULENCE BACTERIENNE :
ETUDE FONCTIONNELLE DU DOMAINE GAP ET DE SES CIBLES SUR LA
REPONSE IMMUNITAIRE CHEZ *DROSOPHILA MELANOGASTER***

Composition du jury :

M. Hans GEISELMANN	<i>Professeur</i>	Président
Mme Marie MEISTER	<i>Docteur</i>	Rapporteur
M. Bruno LEMAITRE	<i>Docteur</i>	Rapporteur
M. Abdelaziz HEDDI	<i>Docteur</i>	Examineur
Mme Marie-Odile FAUVARQUE	<i>Docteur</i>	Directrice de thèse

Thèse préparée dans le laboratoire de Biochimie et Biophysique des systèmes intégrés
UMR 5092 CEA-CNRS-UJF
Dirigé par le Dr Michel SATRE
Département de Réponse et Dynamique Cellulaires
CEA-GRENOBLE

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail : Mme Marie Meister, M. Bruno Lemaitre, M. Abdelaziz Heddi et M. Hans Geiselman président du jury.

Je remercie particulièrement Marie-Odile Fauvarque pour m'avoir encadrée au cours de ces années, pour son enthousiasme permanent et son amitié.

J'exprime ma reconnaissance à Michel Satre qui m'a permis d'intégrer le laboratoire BBSI.

Je remercie Evelyne Bergeret pour m'avoir aidée et soutenue au cours de ces années.

Merci également Jackie Perrin pour son amitié et pour m'avoir supportée dans le même bureau.

Merci aussi aux autres membres de l'équipe, Dominique Thevenon et Emmanuel Taillebourg pour leurs conseils.

Merci à Virginie Ribaud pour sa gentillesse et son aide.

Je remercie Ruth Griffin, Marie Gottar pour leurs discussions constructives.

Mes remerciements vont aussi au Dr Hervé Tricoire pour ses conseils et tous les renseignements qu'il m'a transmis.

Je remercie Marie-Josèphe Rabiet pour son aide lors de la mise au point des tests de mesure de l'activité NADPH-oxydase et Ina Attrée pour ses conseils sur les approches de microbiologie.

Merci à Marie-Claire Joseph pour son aide technique.

Un grand merci à Cécile, Emilie et Agathe pour leur aide et leur amitié.

Enfin je remercie toutes les personnes du laboratoire qui m'ont accompagnée au cours de ces années et à tous ceux qui m'ont soutenue.

Je remercie la Région Rhône-Alpes qui m'a donné les moyens d'effectuer ce travail.

Table des matières

Partie I : Introduction	1
I. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1. Les infections à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
2. Facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	3
3. Le système de sécrétion de type III	6
a. Généralités sur le système de sécrétion type III	6
b. Contribution relative du système de sécrétion de type III dans les infections à <i>P. aeruginosa</i>	8
c. Structure et fonction des protéines effectrices : les exoenzymes	10
4. Les insectes comme modèles d'étude de la virulence de <i>P. aeruginosa</i>	16
a. <i>Galleria mellonella</i>	17
b. <i>Drosophila melanogaster</i>	17
II. Les Rho GTPases chez les mammifères	18
1. Cycle et régulation des Rho GTPases	20
a. Cycle des GTPases monomériques	20
b. Régulation des GTPases monomériques	20
2. Fonction des Rho GTPases	22
a. Les Rho GTPases et cytosquelette	22
b. Voies de signalisation impliquant les Rho GTPases	23
3. Rôle des GTPases dans la réponse immunitaire innée chez les mammifères	24
a. Chimiotactisme et migration cellulaire	25
b. Rôle des Rho GTPases dans la phagocytose	27
c. Les Rho GTPases dans la signalisation dépendante de NF- κ B et par les récepteurs Toll-like (TLRs)	29
d. Régulation de la NADPH-oxydase NOX2 par les Rho GTPases	30
4. Les Rho GTPases : cibles de toxines bactériennes	35
a. Toxines inhibant les Rho GTPases	36
b. Toxines activant les Rho GTPases	36
5. Implication des Rho GTPases dans la réponse au stress de la drosophile	37
III. la réponse immunitaire chez la drosophile	39
1. Les récepteurs de la réponse immunitaire	40
a. Les PGRPs (Peptidoglycan Recognition Protein)	41
b. Les récepteurs GNBP (Gram-Negative Binding Protein)	42
2. Réponse humorale par le corps gras	42
3. Cascade protéolytique : mélanisation, coagulation	50
4. Réponse cellulaire	51
a. Plasmotocytes : phagocytose	51
b. Les cellules à cristaux dans la mélanisation	53
c. Les Lamellocytes : rôle dans l'encapsulation	54
d. Origine des hémocytes : l'hématopoïèse	54
5. La réponse épithéliale	57
6. Implication du NO et des espèces réactives de l'oxygène dans la réponse immunitaire	58
IV. Objectifs	61
Partie II : Matériels et Methodes	63
I. culture bactérienne	63
1. Souches bactériennes et méthode d'infection	63
a. Souches bactériennes, conditions de culture et d'infection	63
b. Conservation des souches bactériennes	64
2. Mesure de la croissance bactérienne	64
II. Génétique de la drosophile	64
1. Souches de drosophiles et croisements	64
2. Recombinaison méiotique chez la drosophile	64
3. Construction de lignées transgéniques	66

III. Détermination du site d'insertion de l'élément P[y+,UAS] dans le génome (UY) par PCR inverse	68
1. Purification de l'ADN génomique.....	68
2. Digestion et circularisation des fragments d'ADN génomique	69
3. PCR (polymerase chain reaction)	69
IV. Analyse de l'expression des gènes.....	70
1. analyse quantitative de l'expression des gènes par Northern blot	70
2. Analyse qualitative de l'expression des gènes par RT-PCR.....	71
V. Test de phagocytose et étude des hémocytes	72
1. phagocytose <i>in vivo</i>	72
2. phagocytose <i>ex vivo</i>	72
3. Marquage des hémocytes larvaires	73
VI. Culture de cellules S2	74
1. ARN interférence (RNAi) en cellules S2	74
2. Test de l'activité de la NADPH-oxydase.....	75
a. Test de la réduction du cytochrome c : activité membranaire de l'enzyme	75
b. Test de la réduction du NBT	76

Partie III : Résultats77

Chapitre I : Effet d'ExoSGAP sur les RhoGTPases et sur la réponse immunitaire de la drosophile77

I. Introduction..... 78

II. Démarche expérimentale pour l'étude d'ExoSGAP par transgénèse chez la drosophile..... 79

III. Résultats 79

1. ExoSGAP cible les Rho GTPases *in vivo*..... 79
 - a. L'expression dirigée d'ExoSGAP perturbe la morphogenèse de l'aile ou de l'œil..... 79
 - b. ExoSGAP inhibe l'activité des Rho GTPases Rac1, Rho1 et Cdc42 *in vivo* 82
 - c. ExoSGAP inhibe l'activité de la Rho GTPase Rac2 *in vivo* 83
2. ExoSGAP affecte la réponse immunitaire de l'hôte 85
 - a. L'expression ubiquitaire d'ExoSGAP affecte la résistance des mouches aux infections par *P. aeruginosa* et *S. aureus*..... 85
 - b. ExoSGAP affecte spécifiquement la réponse immunitaire cellulaire mais pas la réponse humorale associée au corps gras..... 88
 - c. Les drosophiles exprimant ExoSGAP sont plus sensibles aux infections par ingestion 90
3. ExoSGAP n'affecte pas la synthèse des peptides antimicrobiens dépendante de Relish après infection 92
4. ExoSGAP n'affecte pas l'hématopoïèse mais la phagocytose par les plasmatocytes..... 95
 - a. Approche *in vivo* de la phagocytose..... 96
 - b. Approche *ex vivo* de la phagocytose 97

IV. Conclusion 101

Chapitre II : Recherche de modificateurs du phénotype associé à ExoSGAP103

I. Introduction..... 103

II. Méthodologie 104

III. Résultats 106

1. ExoS GAP interfère avec la dynamique du cytosquelette d'actine..... 114
2. ExoSGAP interagit avec les voies de signalisation dépendantes des MAPK et JNK..... 115
 - a. Interaction génétique avec la voie des MAPK 115
 - b. Interaction génétique avec la voie des JNK 115
3. Interaction d'ExoSGAP avec *domino* 117
4. Interactions entre ExoSGAP et des éléments de la réponse immunitaire cellulaire et humorale..... 117
 - a. Effet d'ExoSGAP sur les éléments de la voie Imd 117

b. Effet d'ExoSGAP sur les éléments de la voie Toll	118
c. Interaction d'ExoSGAP avec la GMPc kinase	119
d. Interaction avec des protéines à domaines LITAF	120
5. ExoSGAP et les voies de l'apoptose : vers des mécanismes apoptotiques ou non-apoptotiques ?	120
IV. Conclusion	122
 Chapitre III : Spécificité de Rac2 dans la réponse immunitaire de la drosophile.....	125
I. Introduction.....	125
II. Résultats	126
1. Un mutant <i>Rac2^d</i> est spécifiquement sensible aux infections bactériennes	126
a. Sensibilité des mutants des Rho GTPases aux infections par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	126
b. La contribution de Rac2 dans la résistance aux stress infectieux n'est pas spécifique du type bactérien	128
c. La mutation de <i>Rac2^A</i> affecte la résistance des mouches aux infections par ingestion de <i>P. aeruginosa</i>	130
2. Effet de Rac2 sur l'expression NF-κB dépendante des peptides antimicrobiens et sur la voie des JNK	130
a. Infection par des bactéries à Gram négatif : <i>P. aeruginosa</i>	132
b. La réponse immunitaire après infection par <i>E. faecalis</i> n'est pas perturbée chez la mutant <i>Rac2^d</i> ..	133
3. Rac2 dans l'hématopoïèse	136
a. La mutation <i>Rac2^A</i> affecte la différenciation/multiplication des cellules à cristaux	136
b. Effet de la surexpression de Rac2 sur la morphologie des hémocytes larvaires	138
4. Implication de Rac2 dans la réponse immunitaire cellulaire	139
a. Rac2 participe à la phagocytose des bactéries	140
b. Implication de Rac2 dans l'activation de la production d'ions superoxydes.....	141
III. Conclusion	147
 Chapitre IV : Recherche de gènes impliqués dans la réponse aux stress infectieux et oxydant.....	151
I. Introduction.....	151
II. Résultats	152
1. Résultats généraux	152
2. PSLR une nouvelle protéine de la réponse immunitaire ?	156
3. Implication de la GMPc-kinase dans la réponse immunitaire	159
4. Implication d'une ubiquitine protéase dans la régulation de la voie Imd	160
III. Conclusion	161
 Partie IV : conclusion, perspectives.....	167
 Références bibliographiques	179
 Annexe.....	199

Index des figures

Partie I : Introduction

Figure In. 1 : Modèles des différentes phases d'une infection à <i>P. aeruginosa</i>	3
Figure In. 2 : Exemples d'interactions entre les facteurs de virulence <i>P. aeruginosa</i> et son hôte	4
Figure In. 3 : Modélisation du système de sécrétion de type III	7
Figure In. 4 : Structure de l'exoenzyme S et de son domaine GAP	11
Figure In. 5 : Phylogénie des Rho GTPases des mammifères et de la drosophile	19
Figure In. 6 : Cycle d'activation/inactivation des Rho GTPases monomériques	20
Figure In. 7 : Rho, Rac et Cdc42 contrôlent l'assemblage et l'organisation du cytosquelette d'actine.	22
Figure In. 8 : Modèle simplifié des voies de signalisation impliquant les Rho GTPases et des processus cellulaires contrôlés par les Rho GTPases.	24
Figure In. 9 : Régulation du chimiotactisme par les Rho GTPases et leur localisation cellulaire.	26
Figure In. 10 : Expériences des FRET permettant de suivre la localisation de l'activité des Rho GTPases au cours de la phagocytose dépendante du récepteur FcγR.	29
Figure In. 11 : Synthèse des espèces réactives de l'oxygène et de l'acide hypochlorique	31
Figure In. 12 : Activation de la NADPH-oxydase Nox2 d'après.	32
Figure In. 13 : Alignement des séquences protéiques des GTPases Rac1 et Rac2 de l'homme, de la souris et de la drosophile.	35
Figure In. 14 : Modèle d'activation de la voie Toll chez la drosophile	44
Figure In. 15 : Modèle de l'activation de la voie Imd chez <i>D. melanogaster</i>	46
Figure In. 16 : Morphologie des hémocytes de la drosophile. Photographie à microscopie électronique à transmission.	51
Figure In. 17 : Hématopoïèse chez la drosophile	56
Figure In. 18 : Organisation de la protéine codée par CG3131 (DUOX) (A) et CG3896 (NOX) (B)	60

Partie II : Matériels et méthodes

Figure M. 1 : Principe de la recombinaison méiotique chez la drosophile	66
Figure M. 2 : Structure du transposon P[UAS] _T	66
Figure M. 3 : Principe de la PCR inverse	69

Partie III : Résultats

Chapitre I : Effet d'ExoS^{GAP} sur les RhoGTPases et sur la réponse immunitaire de la drosophile

Figure I. 1 : Le système d'expression inductible et ectopique UAS-Gal4 chez la drosophile	78
Figure I. 2 : Effet de l'expression d'ExoSGAP sur la morphogénèse de l'aile et de l'œil	80
Figure I. 3 : Effet de l'expression d'ExoSGAP sur la morphogénèse de l'aile à 25°C	81
Figure I. 4 : ExoS ^{GAP} inhibe l'activité des Rho GTPases dans l'œil de la drosophile	82
Figure I. 5 : ExoS ^{GAP} inhibe l'activité de Rac2 dans l'œil de la drosophile	84
Figure I. 6 : L'expression ubiquitaire d'ExoSGAP affecte la résistance des mouches aux infections par <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> (CHA et CHA:: <i>exsA</i>).	86
Figure I. 7 : L'expression ubiquitaire d'ExoSGAP affecte la résistance des mouches aux infections par <i>S.</i> <i>aureus</i>	88
Figure I. 8 : L'expression dirigée d'ExoSGAP dans les hémocytes affecte la résistance des mouches aux infections par <i>P. aeruginosa</i> (CHA et CHA:: <i>exsA</i>) et par <i>S. aureus</i>	89
Figure I. 9 : L'expression d'ExoSGAP diminue la résistance des mouches aux infections par ingestion.	91
Figure I. 10 : L'expression des peptides antimicrobiens après infection par <i>P. aeruginosa</i> n'est pas affectée par l'expression ubiquitaire d'ExoSGAP.	93
Figure I. 11 : L'induction de la voie des JNK par n'est pas affectée par l'expression ubiquitaire d'ExoSGAP après infection par <i>P. aeruginosa</i>	94
Figure I. 12 : Diminution de la phagocytose <i>in vivo</i> , lorsqu'ExoS ^{GAP} est exprimé par les hémocytes	97
Figure I. 13 : L'expression d'ExoS ^{GAP} par les hémocytes inhibe la phagocytose <i>ex vivo</i>	98

Chapitre II : Recherche de modificateurs du phénotype associé à ExoSGAP

Figure II. 1 : Principe de la mutagenèse de dérégulation et de recherche des partenaires génétiques d'ExoSGAP	105
Figure II. 3 : Exemples de quelques gènes candidats modifiant le phénotype lié à l'expression d'ExoSGAP dans l'œil	112
Figure II. 4 : Exemples de quelques gènes candidats modifiant le phénotype lié à l'expression d'ExoSGAP dans l'aile à température ambiante	113
Figure II. 5 : Modèle simplifié des interactions possibles d'ExoSGAP avec les voies de signalisation de la drosophile	123

Chapitre III : Spécificité de Rac2 dans la réponse immunitaire de la drosophile

Figure III. 1 : Sensibilité des mutants <i>Rac2^d</i> aux infections par piqûre septique par différentes souches bactériennes à Gram négatif	129
Figure III. 2 : Sensibilité des mutants <i>Rac2^d</i> aux infections par piqûre septique par différentes souches de bactéries à Gram positif	130
Figure III. 3 : Sensibilité des mutants <i>Rac2^d</i> aux infections par ingestion de <i>P. aeruginosa</i> (PAO1)	131
Figure III. 4 : <i>Rac2</i> participe à l'activation de la voie des JNK	132
Figure III. 5 : Confirmation par RT-PCR de l'effet de la mutation de <i>Rac2</i> sur l'activation de <i>puckered</i> 18 heures après infection.	133
Figure III. 6 : Effet de la surexpression de <i>Rac2</i> sur l'activation de <i>puc</i>	134
Figure III. 7 : <i>Rac2</i> n'est pas nécessaire à l'activation de la transcription de la drosomycine après infection par la bactérie à Gram positif <i>Enterococcus faecalis</i>	136
Figure III. 8 : Morphologie des hémocytes larvaires mutant <i>Rac2^d</i> et différenciation des cellules à cristaux ..	138
Figure III. 9 : Effet de la surexpression de <i>Rac2</i> sur la morphologie des hémocytes	139
Figure III. 10 : Test de la réduction du NBT, mise en évidence de l'activité NADPH-oxydase des cellules S2.	145
Figure III. 11 : Localisation des séquences de Rac1 et Rac2 ciblées par les dsRNA.	146
Figure III. 12 : Modèle de l'implication de Rac2 dans la réponse immunitaire chez la drosophile	149

Chapitre IV : Recherche de gènes impliqués dans la réponse aux stress infectieux et oxydant

Figure IV. 1 : Recherche de gènes impliqués dans la réponse au stress	152
Figure IV. 2 : Expression de la protéine fusion FER1HCH-GFP (lignée G00237) dans les hémocytes larvaires.	156
Figure IV. 3 : Vérification par Northern blot de la surexpression de CG6014 (lignée UY1631) sous le contrôle de da-Gal4	157
Figure IV. 4 : Effet de la surexpression de CG6014 ou de l'insertion UY1631 sur la résistance aux infections par piqûre septique par PAO1.	157
Figure IV. 5 : Etude par Northern blot de l'effet de la surexpression de CG6014 et de la dérégulation la GMPc kinase sur l'activation de la voie des JNK.	158

Partie IV : conclusion, perspectives

Figure ccl. 1 : Modèle hypothétique des interactions de <i>P. aeruginosa</i> avec la réponse immunitaire de la drosophile.	178
---	-----

Index des tableaux

Partie I : Introduction

Tableau In. 1 : Localisation cellulaires des différentes NOX/DUOX des mammifères d'après Lambeth (2004)	31
Tableau In. 2 : Toxines bactériennes ciblant les Rho GTPases d'après Aktories (2005)	37
Tableau In. 3 : Expression et spécificité des peptides antimicrobiens, d'après Hoffmann (2002)	40

Partie II : Matériels et méthodes

Tableau M. 1 : Sources des matrices d'ADN pour préparer les sondes marquées ³² P.	71
Tableau M. 2 : Oligonucléotides utilisés pour la PCR.	74

Partie III : Résultats

Chapitre I : Effet d'ExoSGAP sur les RhoGTPases et sur la réponse immunitaire de la drosophile

Tableau I. 1 : L'expression dirigée d'ExoSGAP avec srp-Gal4 inhibe la phagocytose des particules mortes de <i>E. coli</i> couplées à la fluorescéine	99
Tableau I. 2 : L'expression dirigée d'ExoSGAP avec srp-Gal4 inhibe la phagocytose des particules mortes de <i>S. aureus</i> couplées à la fluorescéine	99
Tableau I. 3 : L'expression dirigée d'ExoSGAP avec crq-Gal4 inhibe la phagocytose des particules mortes de <i>E. coli</i> couplées à la fluorescéine	100
Tableau I. 4 : L'expression dirigée d'ExoSGAP avec crq-Gal4 inhibe la phagocytose des particules mortes de <i>S. aureus</i> couplées à la fluorescéine	100

Chapitre II : Recherche de modificateurs du phénotype associé à ExoSGAP

Tableau II. 1 : Partenaires génétiques d'ExoSGAP	107
Tableau II. 2 : Effet de la perte de fonction des gènes candidats sur le phénotype associé à ExoSGAP	111

Chapitre III : Spécificité de Rac2 dans la réponse immunitaire de la drosophile

Tableau III. 2 : Sensibilité des mutants des Rho GTPases aux infections	127
Tableau III. 3 : Les hémocytes larvaires <i>Rac2^Δ</i> présentent une déficience de phagocytose des particules issues de bactéries à Gram négatif (<i>E. coli</i>) marquées à la fluorescéine par rapport aux hétérozygotes <i>Rac2^{Δ/+}</i>	141
Tableau III. 4 : La mutation <i>Rac2^Δ</i> diminue la phagocytose des particules mortes de <i>S. aureus</i> couplées à la fluorescéine	141

Chapitre IV : Recherche de gènes impliqués dans la réponse aux stress infectieux et oxydant

Tableau IV. 1 : Détermination du site d'insertion de l'élément UY dans le génome pour cinq lignées candidates	154
Tableau IV. 2 : Gènes candidats dont la dérégulation permet une meilleure résistance aux infections par PAO1 par piqûre septique	162
Tableau IV. 3 : Gènes candidats dont la dérégulation induit une sensibilité aux infections par PAO1 par piqûre septique	165
Tableau IV.4 : Exemples de quelques tests complémentaires sur des gènes candidats	166

Principales abréviations

aa : acide aminé
A.tumefaciens : *Agrobacterium tumefaciens*
ADP : Adénosine DiPhosphate
ADN : Acide DésoxyRibonucléique
ExoSADPRT : domaine ADP Ribosyl Transférase de l'exoenzyme S
ARN : Acide RiboNucléique
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
CDI : Center DIvider
CFU : Colony Forming Unit
CRD : Carbohydrate-Recognition Domain
DIF : Dorsal-related Immune Factor
Dredd : Death related ced-3/Nedd2-like protein
DRSC : Drosophila RNAi screening center
dsRNA : double strand RNA
E. cloecae : *Enterobacter cloecae*
E. coli : *Escherichia coli*
E. faecalis : *Enterococcus faecalis*
ExoS : Exoenzyme S
ExoSGAP : domaine GAP d'ExoS
FAS : Factor Activating Exoenzyme S
GAP : GTPase Activating Protein
GDI : GTPase Dissociation Factor
GDP : Guanosine Di Phosphate
GEFs : Guanine Nucleotide Exchange Factor
GMPC : Guanosine MonoPhosphate cyclique
GTP : Guanosine Tri Phosphate
GTPases : Rac Guanosine Triphosphatase
I-κB : Inhibitor of NF-κB
IKK : I-κB kinase
Imd : IMmune Deficiency
JNK : JuN Kinase
LPS : LipoPolySaccharide
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MBL : Mannose Binding Lectin
MMR : Macrophage Mannose Receptor
Mtl : Mig-2-like
M. luteus : *Micrococcus luteus*
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
NF-κB : Nuclear Factor kappaB
NO : Nitric Oxide (oxyde nitrique)
NOX : NADPH-oxydase
PCR : Polymerase Chain Reaction
PMA : Phorbol Myristate Acétate
PSLR : *Pseudomonas* Sensitive Lectin Receptor
puc : puckered
ROS : Reactive Oxygen Species (espèce réactives de l'oxygène)
RNAi : RNA interference (ARN interference)
RT-PCR : Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction
S. aureus : *Staphylococcus aureus*
SSTT : Système de Sécrétion de Type III
TAK1 : TGF-beta-Activated Kinase 1
TLR : Toll-Like Receptor
TNF : Tumour Necrosis Factor α
TRAF : TNF-Receptor-Associated Factor
UAS : Upstream Activating Sequence

PARTIE I

INTRODUCTION

En permanence, les organismes vivants sont susceptibles d'être en contact avec des pathogènes comme des bactéries, des virus, des champignons, des parasites... Ils ont développé des mécanismes de défense pour lutter contre ces agents infectieux. Ces mécanismes de défense sont tout d'abord physiques comme par exemple les épithélia ou la cuticule chez les insectes. Certains épithélia peuvent aussi produire des peptides antimicrobiens et des molécules inflammatoires. Il existe surtout une réponse immunitaire qui repose sur des cellules de la lignée sanguine qui vont par exemple sécréter des molécules inflammatoires ou cytokines, des molécules toxiques et phagocyter les pathogènes. Chez les vertébrés, on distingue classiquement deux types de réponse, une réponse immédiate dite innée et une réponse dite adaptative ou spécifique.

La réponse immunitaire innée est un système de défense ancien présent dans la majorité des métazoaires comme chez les insectes dont la drosophile et chez l'homme. C'est une réponse efficace aux infections qui repose notamment sur la reconnaissance de motifs microbiens, sur la sécrétion d'agents microbicides à spectre d'activité plus ou moins large ainsi que sur la phagocytose des pathogènes. De plus, chez les vertébrés, la réponse immunitaire innée est nécessaire à l'activation de la réponse immunitaire adaptative. L'immunité adaptative dépend de l'activation des lymphocytes et de la synthèse par les lymphocytes B d'immunoglobulines ou anticorps capables de reconnaître des antigènes précis et qui sont nécessaires à l'élimination du pathogène.

Au laboratoire nous nous intéressons plus particulièrement à l'immunité innée.

De nombreuses bactéries pathogènes ont développé des mécanismes de résistance et de virulence qui leur permettent d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte et qui facilitent leur développement. C'est par exemple le cas de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, un pathogène opportuniste chez l'homme, qui peut infecter des personnes ayant une déficience du système immunitaire (grands brûlés, personnes atteinte du SIDA ou de certains cancers...). Cette bactérie possède différents mécanismes de virulence qui vont lui permettre de moduler la réponse immunitaire et le comportement cellulaire de l'hôte. Notamment, le système de sécrétion de type **III** (SSTT), présent dans certaines bactéries à Gram négatif, permet l'injection d'exotoxines directement dans le cytoplasme de la cellule hôte afin d'en perturber le fonctionnement. Parmi les exotoxines de *P. aeruginosa*, nous avons étudié l'Exoenzyme S (ExoS) qui perturbe l'activité des Rho GTPases. Les Rho GTPases jouent un rôle central dans la réponse immunitaire en régulant de nombreux processus comme la phagocytose et l'explosion oxydative.

La drosophile est devenue un modèle pour l'étude de la réponse immunitaire innée du fait de la conservation avec les mammifères, des mécanismes immunitaires et des voies de signalisation, telles que les voies régulant les facteurs de transcription de type NF- κ B (Nuclear Factor κ B) et la voie des JNK (Jun kinase).

Dans ce contexte, mon travail de thèse a consisté en l'étude de l'exoenzyme S de *P. aeruginosa* par une approche de transgénèse chez la drosophile. Ceci m'a ensuite amenée à comprendre la fonction des Rho GTPases dans la réponse immunitaire chez la drosophile. Parallèlement, je me suis servie de *P. aeruginosa* comme agent infectieux afin de rechercher de nouveaux éléments de la réponse immunitaire chez la drosophile.

I. *Pseudomonas aeruginosa*

La bactérie *P. aeruginosa* est une bactérie à Gram négatif qui se développe dans des milieux très variés souvent humides comme l'eau, le sol et les végétaux et dans une large gamme de température allant de + 4°C à + 41°C. Elle peut aussi se retrouver à l'état commensal dans l'organisme au niveau de la peau et dans le tube digestif.

C'est un pathogène mobile capable d'infecter une grande variété d'organismes dont les plantes, l'amibe *Dictyostelium discoideum*, le nématode *Caenorhabditis elegans*, les insectes dont *Drosophila melanogaster* et les mammifères dont l'homme (Jander et al., 2000; Mahajan-Miklos et al., 2000; Rahme et al., 2000; D'argenio et al., 2001; Cosson et al., 2002). Les mêmes mécanismes de virulence sont activés dans ces différents organismes hôtes (Mahajan-Miklos et al., 2000; Rahme et al., 2000).

1. Les infections à *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa n'est pas un pathogène pour l'homme en bonne santé, c'est un opportuniste, fréquemment retrouvé dans les infections nosocomiales. Cette bactérie est en effet responsable de 16% des pneumonies nosocomiales, 12% des infections du tractus urinaire acquises à l'hôpital, 8% des infections liées aux interventions chirurgicales et 10% des infections du flux sanguin (Van Delden et Iglewski, 1998; Lyczak et al., 2000). Elle infecte généralement les personnes ayant une déficience du système immunitaire comme les grands brûlés, les personnes atteintes du SIDA (Syndrome d'Immuno-Déficience Acquise), les individus souffrants de cancers neutropéniques et surtout les malades atteints de la

mucoviscidose. La colonisation rapide chez les grands brûlés conduit à la septicémie. Chez les personnes souffrant de mucoviscidose, *P. aeruginosa* peut se développer et coloniser l'arbre trachéo-bronchéal. 90 % des patients atteints de cette maladie génétique meurent d'une infection chronique à *P. aeruginosa* (Fig In.1).

Cette bactérie a développé des mécanismes de résistance à de nombreux antibiotiques et elle est capable de s'adapter à de nouveaux environnements dont ceux liés à l'activité humaine (canalisations, siphons, milieu hospitalier...), ce qui en fait l'un des pathogènes responsables d'infections nosocomiales les plus redoutés.

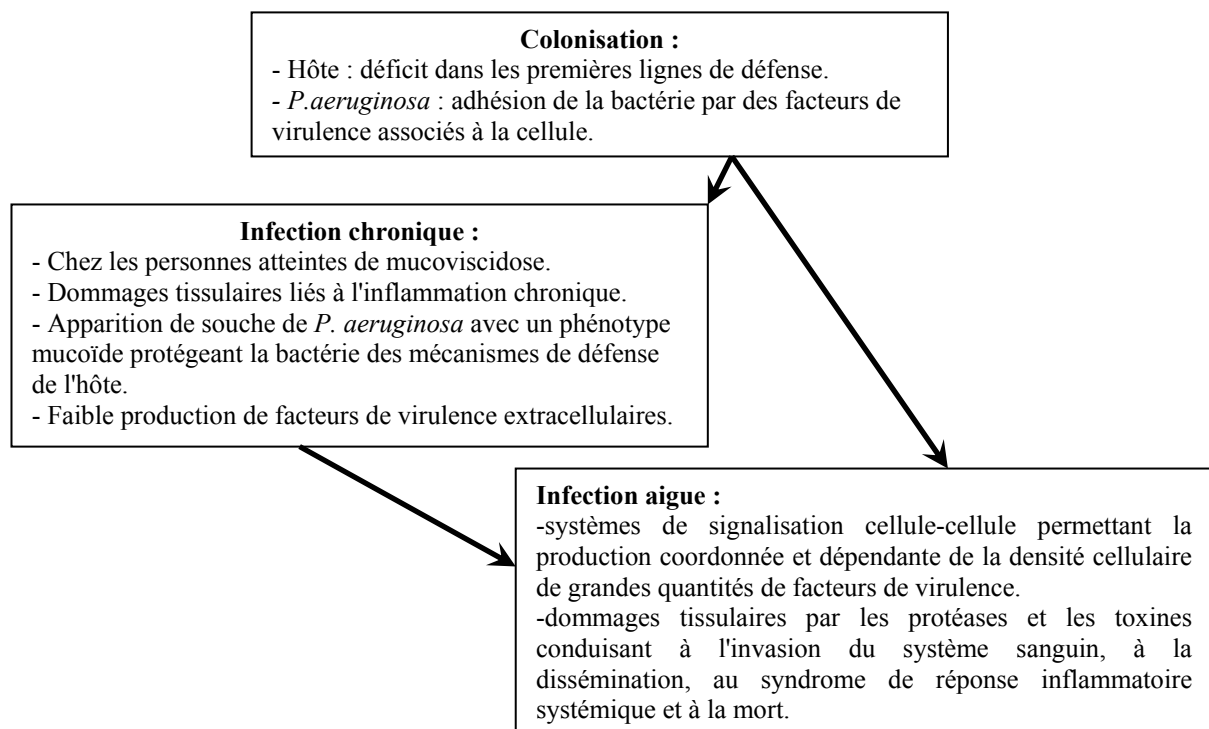


Figure In. 1 : Modèle des différentes phases d'une infection à *P. aeruginosa* d'après Van Delden et Iglewski (1998)

2. Facteurs de virulence de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa possède de nombreux systèmes de virulence qui lui permettent de survivre et de se développer dans ses hôtes (Fig. In.2) (Van Delden et Iglewski, 1998).

Lors des infections chroniques du système respiratoire, les bactéries adhèrent à la surface de l'épithélium grâce à des adhésines comme la *fimbrae*, le pili de type IV, le LPS (Lipopolysaccharide) et le flagelle. Elles vont ensuite former un biofilm composé d'une matrice d'exopolysaccharides mucoïdes (MEP) faite d'alginate qui protège les bactéries des

systèmes de défense de l'hôte et de l'effet des antibiotiques (Van Delden et Iglewski, 1998; Lyczak et al., 2000; Vallet et al., 2004).

En général, les facteurs de virulence impliqués dans l'adhérence peuvent aussi avoir un rôle dans la mobilité de la bactérie tels que le flagelle, le pilus de type IV (Kohler et al., 2000).

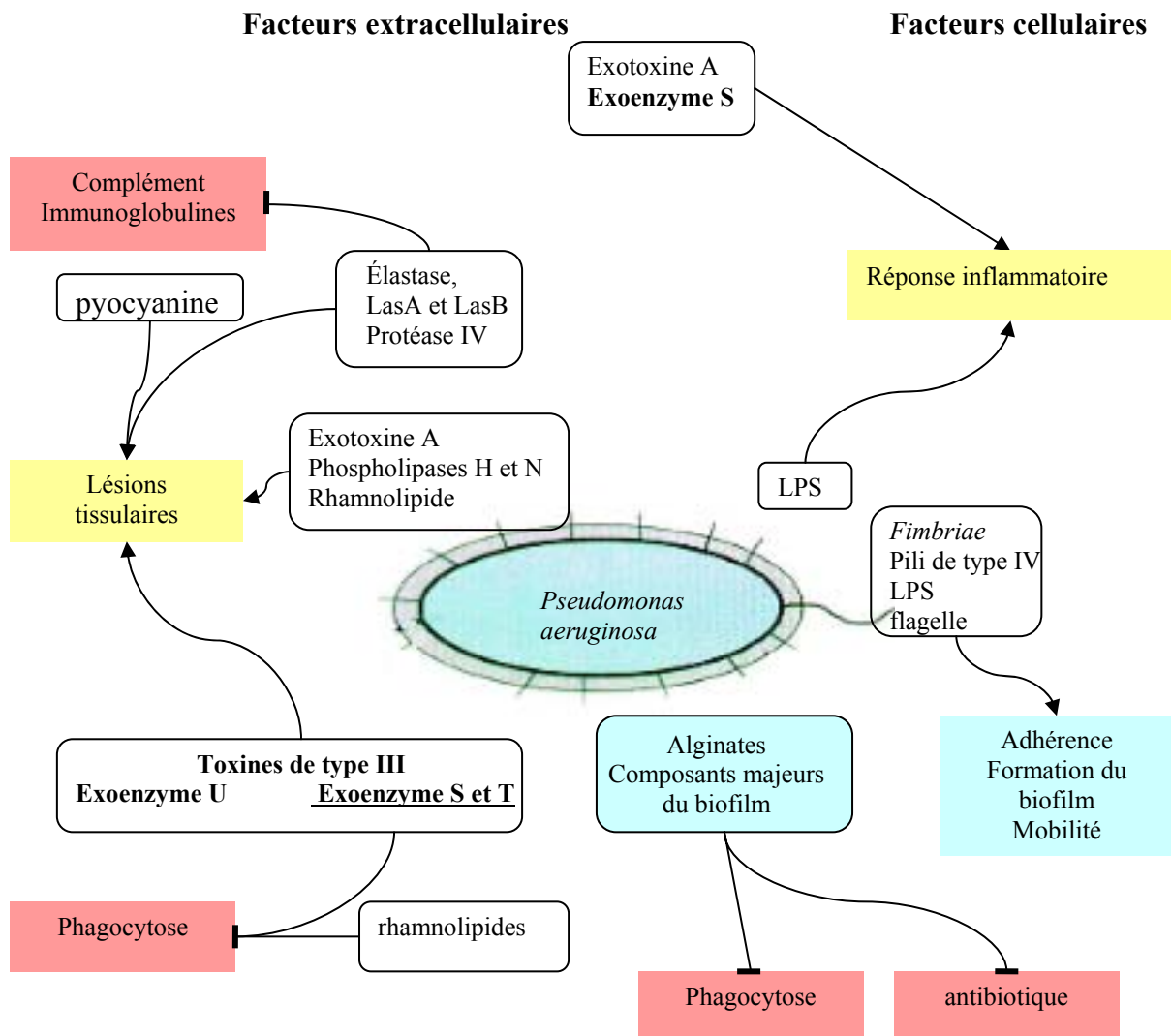


Figure In. 2 : Exemples d'interactions entre les facteurs de virulence *P. aeruginosa* et son hôte

Le LPS (lipopolysaccharide) est un composant de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, il a un rôle protecteur contre la lyse provoquée par le sérum et possède une activité endotoxique. C'est aussi un stimulateur de la réponse inflammatoire et immunitaire pouvant provoquer un choc septique.

Des expériences ont montré que la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) impliquée dans le transport des ions chlorures et qui est mutée chez

les personnes atteintes de mucoviscidose, interagit avec le LPS pour permettre l'internalisation des bactéries par les cellules épithéliales pulmonaires (Pier et al., 1996a; Pier et al., 1996b; Darling et al., 2004). Le rôle de cette internalisation n'est pas complètement élucidé, les cellules pulmonaires pourraient desquamer et être évacuées par le mécanisme de clairance mucociliaire. Il a aussi été montré que cette reconnaissance du LPS induit l'activation de la réponse immunitaire innée à travers l'activation des facteurs de transcription NF- κ B (Schroeder et al., 2002). L'internalisation par des cellules épithéliales humaines ECV, peut aussi conduire à la mort des cellules par apoptose, cette mort est liée à la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS : **R**eactive **O**xygen **S**pecies) qui sert à l'élimination des bactéries mais qui ont parallèlement des effets délétères sur les cellules (Valente et al., 2000).

Il existe un grand nombre de facteurs de virulence, impliqués dans la colonisation de l'hôte.

- L'exotoxine A est le composé le plus toxique de *P. aeruginosa*. Elle agit spécifiquement sur le facteur d'élongation 2 (**EF2**), ce qui entraîne l'arrêt de la synthèse protéique et la mort des cellules par nécrose ou par apoptose pour les mastocytes (Wick et al., 1990; Jenkins et al., 2004).
- Les élastases (LasA et LasB) sont des métalloprotéases qui dégradent l'élastine (un composant de tissu pulmonaire), elles inactivent aussi de nombreuses protéines telles que les immunoglobulines (IgA et IgG) (Heck et al., 1990).
- Les phospholipases C sont des enzymes extracellulaires qui interviennent dans la virulence bactérienne.
- Les rhamnolipides sont des glycolipides extracellulaires, ils ont un effet détergent. Ils sont entre autres capables d'inhiber la phagocytose (McClure et Schiller, 1996).
- La pyocyanine est retrouvée chez les patients souffrant de mucoviscidose. Elle a de nombreux effets sur les cellules pulmonaires et semble être un facteur de virulence important au cours de l'infection à *P. aeruginosa*. C'est pourquoi *P. aeruginosa* est aussi connue sous le nom de bacille pyocyanique (Lau et al., 2004).

L'expression de ces facteurs de virulence est régulée par différents mécanismes dont le quorum-sensing qui dépend de la communication entre les bactéries et de leur concentration (Donabedian, 2003).

La sécrétion de certains facteurs de virulence dans l'environnement extracellulaire dépend de différents mécanismes de sécrétion (Thanassi et Hultgren, 2000).

- Le système de sécrétion de type I également appelé transporteur ABC (ATP-Binding-Cassette) permet la sécrétion à travers les deux membranes de la bactérie en une seule étape.
- Le système de sécrétion de type II ou sécrétion sec-dépendante s'effectue en deux étapes. Les protéines traversent d'abord la membrane interne soit par un système sec-dépendant qui nécessite de l'ATP soit par le système de sécrétion à double arginine Tat (Twin-arginine-translocation). Les protéines traversent ensuite la membrane externe par deux machineries, qui sont le système Xcp et le système Hxc chez *P. aeruginosa* (Voulhoux et al., 2001; Ball et al., 2002).
- Le système de sécrétion de type V ou auto-transporteur est un mécanisme sec-dépendant. Les protéines sont tout d'abord exportées dans le périplasme par la machinerie sec, puis les protéines sécrétées forment elles-mêmes un pore dans la membrane externe au travers duquel la partie N-terminale est sécrétée puis clivée.
- Finalement le système de sécrétion de type III permet l'injection des exoenzymes de type III directement dans le cytoplasme de la cellule hôte. L'exoenzyme S qui est l'objet principal de cette étude, est sécrétée par cette voie.

3. Le système de sécrétion de type III

a. Généralités sur le système de sécrétion type III

L'appareil de sécrétion de type III consiste en une structure en aiguille composée d'une vingtaine de protéines dont les gènes correspondant sont regroupés en opéron sur le chromosome bactérien chez *P. aeruginosa*. Cette structure en aiguille permet de former un pore au niveau de la membrane de la cellule eucaryote hôte et de transloquer des toxines de type III / exoenzymes depuis le cytoplasme bactérien vers celui de la cellule hôte. Ces toxines, une fois dans le cytoplasme de la cellule eucaryote vont détourner le fonctionnement cellulaire au profit du pathogène et perturber notamment les systèmes de défense de l'organisme infecté. C'est un mécanisme de virulence spécifique des bactéries à Gram négatif pathogènes comme *Yersinia* spp, *Shigella* spp et *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* (Hueck, 1998).

C'est le plus complexe des systèmes de sécrétion connus (Fig. In.3). L'ensemble de ce système est composé de cinq classes de protéines. Les constituants de l'injectisome qui permettent le passage des protéines à travers les deux membranes bactériennes. Une ATPase cytoplasmique associée à la membrane fournit l'énergie nécessaire au transport. Les protéines composant le canal ou translocon sont nécessaires au passage des effecteurs à travers la membrane cytoplasmique. Il existe aussi des protéines chaperonnes et des protéines régulatrices. Ces dernières interviennent dans la régulation transcriptionnelle du système de sécrétion. Les exoenzymes sont les protéines ou toxines effectrices qui sont transloquées par ce système dans le cytoplasme de la cellule hôte (Tampakaki et al., 2004).

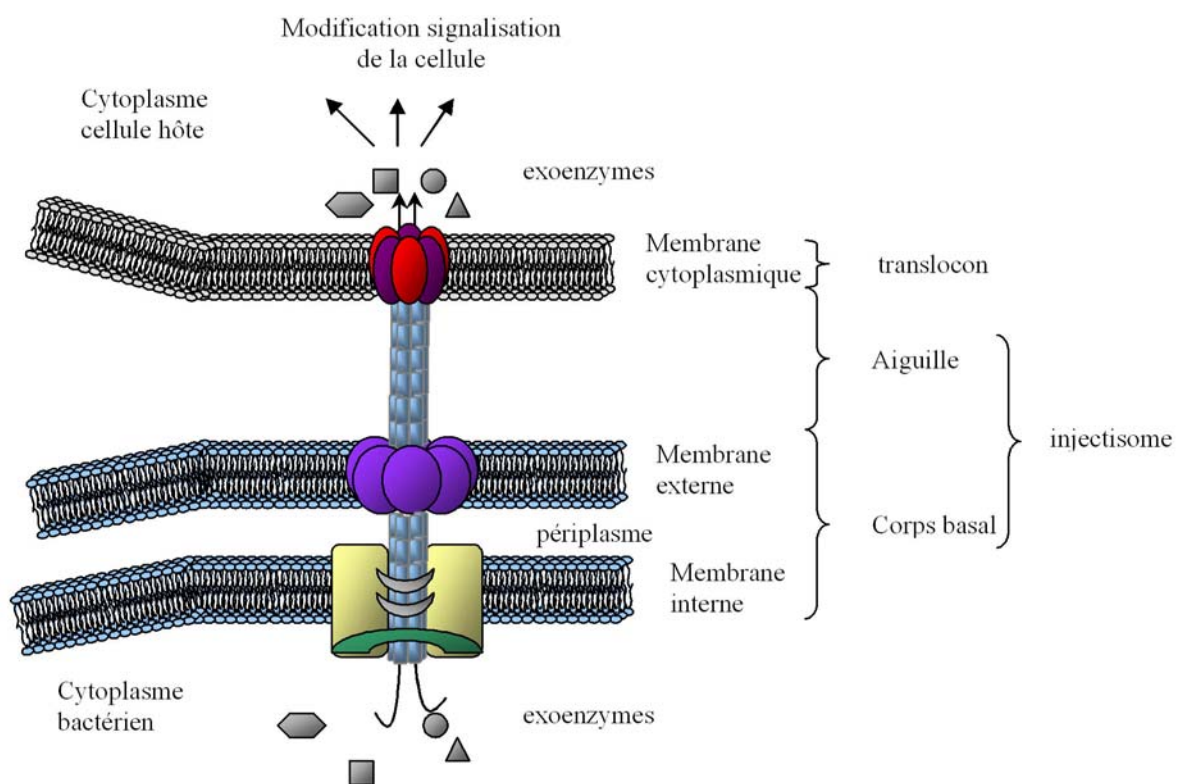


Figure In. 3 : Modélisation du système de sécrétion de type III

Chez *P. aeruginosa* la formation du pore de translocation dépend de l'insertion dans la membrane de la cellule hôte des protéines PopB et PopD et nécessite l'intervention de la protéine PcrV (Dacheux et al., 2001; Goure et al., 2004)

Le signal permettant la sécrétion des effecteurs est de nature controversée. Des études suggèrent la présence d'un peptide signal dans les 15 à 20 premiers acides aminés bien qu'aucune séquence consensus n'ait pu être mise en évidence. Cette séquence est en effet suffisante à la sécrétion des effecteurs. Néanmoins, des mutations de ce peptide, tout comme des changements du cadre de lecture n'ont pas d'effet sur la sécrétion. Une autre hypothèse

serait que le signal de sécrétion résiderait dans la partie 5' des ARNm qui formerait une structure en tige-boucle permettant l'interaction avec l'appareil de sécrétion. La sécrétion pourrait aussi nécessiter la présence des protéines chaperonnes ayant un rôle dans la hiérarchisation de la sécrétion (Ramamurthi et Schneewind, 2003).

b. Contribution relative du système de sécrétion de type III dans les infections à *P. aeruginosa*

Chez *P. aeruginosa*, le système de sécrétion de type III est activé par un contact cellulaire *in vivo*. Certaines conditions de culture comme la déplétion en Ca^{++} permettent de l'induire (Vallis et al., 1999; Horneff et al., 2000; Francis et al., 2002).

L'expression des gènes codant pour le SSTT est régulée au niveau transcriptionnel par un activateur de la transcription de type AraC, le facteur ExsA codé par l'opéron transrégulateur *exsCBA* (Frank, 1997). Une mutation de cette protéine ne permet plus l'expression des gènes du système de sécrétion de type III (Yahr et al., 1995).

L'ensemble des mécanismes de régulation du SSTT qui dépendent de l'activation de nombreuses protéines régulatrices, ne sera pas présenté dans cette introduction. Cette régulation du SSTT est en cours d'étude au laboratoire par le Dr. S. Elsen qui recherche les mécanismes d'activation du SSTT au contact des cellules de type macrophage et de la drosophile.

Chez *P. aeruginosa*, le SSTT permet l'injection dans le cytoplasme de la cellule hôte de quatre toxines qui sont l'exoenzyme S (ExoS), l'exoenzyme T (ExoT), l'exoenzyme Y (ExoY) et l'exoenzyme U (ExoU). Les toxines de type III sont exprimées de manière différentielle entre les souches de *P. aeruginosa*. Les deux toxines ExoU et ExoS sont, sauf exception, exclusives (Fleiszig et al., 1998; Feltman et al., 2001; Lomholt et al., 2001; Berthelot et al., 2003). L'expression de ces toxines augmente la virulence de la bactérie aussi bien sur des cellules en culture qu'*in vivo* sur des modèles d'infection comme la souris.

➤ Rôle du système de sécrétion de type III dans les infections à *P. aeruginosa* chez l'homme

La présence d'un système de sécrétion de type III fonctionnel dans les isolats cliniques de patients infectés est à l'origine d'une augmentation de bactériémies et de lésions d'organes ainsi que d'un taux de mortalité six fois plus élevé (Roy-Burman et al., 2001). ExoT est

l'enzyme la plus récurrente dans ces souches. Des différences d'expression d'ExoS et ExoU en fonction des isolats cliniques ont été observées. ExoS est fréquemment retrouvée dans les isolats cliniques issus de personnes atteintes de mucoviscidose ou de pathologies pulmonaires (Dacheux et al., 2000; Lomholt et al., 2001; Lee et al., 2005c). Par contre, elle est moins fréquente dans les souches issues de personnes atteintes d'infections cornéennes auriculaires et urinaires (Fleiszig et al., 1996; Lomholt et al., 2001; Berthelot et al., 2003). Des études d'isolats cliniques issus de patients atteints de mucoviscidose montrent une évolution des souches bactériennes au cours de l'infection, les isolats issus de patients atteints d'infection à un stade précoce ont un système de sécrétion de type III fonctionnel et sont cytotoxiques au contraire des souches isolées quelques années plus tard chez les mêmes patients. Les bactéries auraient accumulé des mutations dans les gènes de régulation du système de sécrétion de type III au cours des années (Jain et al., 2004; Lee et al., 2005c). Chez les personnes atteintes de mucoviscidose, on observe l'émergence de souches ayant acquis un phénotype mucoïde (Govan et Deretic, 1996). ExoU est peu retrouvée dans les souches issues de personnes atteintes de mucoviscidose (Dacheux et al., 2000; Feltman et al., 2001; Jain et al., 2004). Il est par-contre un marqueur de la haute virulence de *P. aeruginosa* dans les pneumonies acquises à l'hôpital, alors qu'ExoS et ExoT ne sont pas associées à une plus grande virulence (Schulert et al., 2003).

Afin de comprendre l'implication du système de sécrétion de type III et des exoenzymes dans la virulence de la bactérie, un certain nombre de modèles cellulaires et animaux ont été développés.

➤ **Implication du système de sécrétion de type III dans les modèles de cellules en culture**

Bien que *Pseudomonas aeruginosa* soit un pathogène considéré comme extracellulaire, il peut aussi être internalisé par certaines cellules. Le rôle de cette internalisation dans la pathogénicité n'est pas clair. Les bactéries peuvent être internalisées par les cellules épithéliales en culture MDCK (**M**adin-**D**arby **C**anine **K**idney). Dans ce cas, l'internalisation dépend des Rho GTPases et elle est facilitée au niveau de la surface basolatérale des cellules, montrant qu'une barrière épithéliale intacte participe à la résistance contre *P. aeruginosa* (Fleiszig et al., 1998; Kazmierczak et al., 2004).

Les toxines du système de sécrétion de type III induisent entre autres des changements morphologiques des cellules épithéliales, altèrent le cytosquelette d'actine pour inhiber la phagocytose par les macrophages et elles conduisent à des dommages cellulaires (Coburn et Frank, 1999; Dacheux et al., 1999; Hauser et Engel, 1999). Les effets liés aux systèmes de sécrétion de type III sont variables, ils dépendent à la fois des cellules cibles, du fond génétique des souches bactériennes utilisées qui n'expriment peut-être pas les toxines avec la même efficacité, et des conditions expérimentales.

Par exemple, la souche non invasive PA103, pouvant sécréter ExoT et ExoU, induit une mort apoptotique dépendante du type III, mais indépendante d'ExoU, des cellules de type macrophages J774A ou épithéliales HeLa, alors que la mort des cellules MDCK nécessite la sécrétion d'ExoU (Hauser et Engel, 1999). D'autres expériences sur des cellules J774 et des cellules polymorphonucléaires humaines ont montré que la souche CHA cytotoxique (ExoS, ExoT) induit une mort oncotique dépendante du SSTT. Cette mort est associée à la formation du pore au niveau membranaire, qui nécessite l'intervention de la protéine de type III, PcrV et des protéines du pore de translocation PopB et PopD (Dacheux et al., 1999; Dacheux et al., 2001) (Fig. In.3). Ce pore est en cours de caractérisation fonctionnelle et structurale au laboratoire (Dr Ina Attrée et Dr Eric Faudry).

Les effets relatifs des toxines et du système de sécrétion de type III ont aussi été étudiés sur des modèles mammifères dans différents types d'infection. Là encore l'interprétation de la fonction des toxines est difficile, en raison des différences de modèle de pathogénicité (infection cornéenne, pneumopathie...) qui ne reproduisent pas complètement les pathologies humaines.

c. Structure et fonction des protéines effectrices : les exoenzymes

➤ L'Exoenzyme S

• Effets d'ExoS dans la cellule

L'exoenzyme S est la mieux caractérisée des cytotoxines, elle est souvent associée au caractère invasif des souches bactériennes. Elle est transloquée dans le cytoplasme de la cellule hôte et elle peut être aussi retrouvée dans le milieu extracellulaire. Ses fonctions moléculaires et cellulaires sont connues *in vitro* et dans les cellules en culture ; son rôle dans un organisme entier et les voies de signalisation affectées par cette toxine sont néanmoins mal définis.

Il s'agit d'une protéine bifonctionnelle de 49 kDa (453 acides aminés), qui possède un domaine GAP (GTPases activating protein) dans sa partie N-terminale (Goehring et al., 1999), entre les résidus 96 et 234, l'Arginine 146 est nécessaire à son activité GAP (Pederson et al., 2000; Pederson et al., 2002). La partie C-terminale possède une activité ADP-ribosyl-transférase (Fig In.4). C'est une protéine capable de s'auto-agréger par son domaine N-terminal (Knight et al., 1995; Kulich et al., 1995).

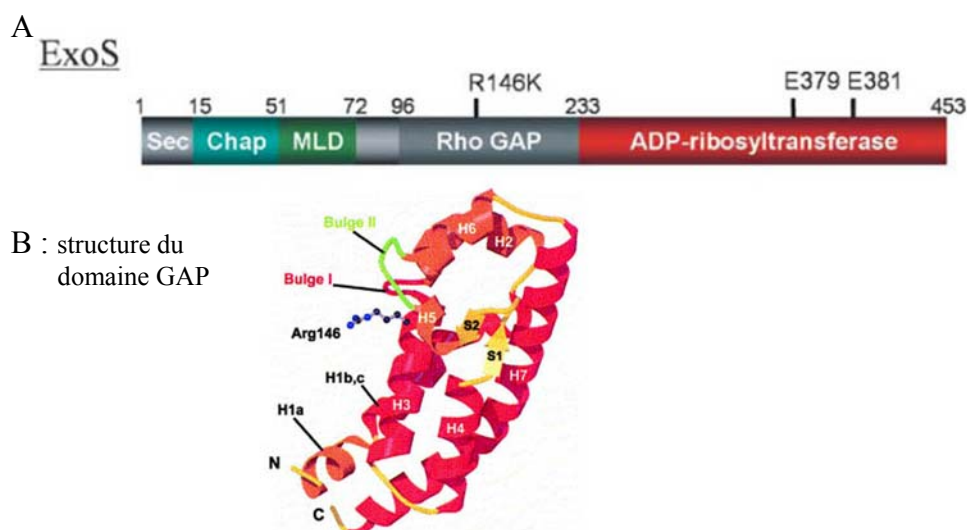


Figure In. 4 : Structure de l'exoenzyme S (Barbieri et Sun, 2004) et de son domaine GAP (Wurtele et al., 2001)

A : structure d'ExoSGAP. sec : peptide signal nécessaire à la sécrétion par le système de sécrétion de type III Chap : domaine de liaison à la chaperonne (orf1). MLD : domaine de localisation à la membrane (région riche en leucine). RhoGAP domaine GAP, R146 résidu catalytique. Domaine ADP-ribosyl transférase E381 domaine catalytique, E379 nécessaire au transfert de l'ADP-ribose.

B : structure du domaine GAP, la structure 3D ne présente pas d'homologie avec les RhoGAPs des mammifères, mais ExoSGAP stabilise l'état de transition de la réaction de la GTPase, indiquant que ce domaine mime les GAPs eucaryotes.

ExoS peut être cytotoxique pour les cellules en culture et induire des changements morphologiques (Knight et al., 1995; Frithz-Lindsten et al., 1997; Olson et al., 1997; McGuffie et al., 1998). Les cellules répondent différemment à la toxine en fonction de leur état ou de leur origine : des cellules NK (Normal Kidney), lorsqu'elles sont à confluence, sont plus résistantes aux effets d'ExoS que les cellules sub-confluentes ou que les cellules confluentes dissociées chimiquement, suggérant ainsi que la présence de facteurs eucaryotes est nécessaire à la translocation lors de la phase de croissance des cellules eucaryotes (McGuffie et al., 1999). Récemment, il a été montré que les cellules HL-60 (cellules de la lignée myéloïde) indifférenciées sont résistantes aux effets toxiques d'ExoS sécrétée par *P. aeruginosa*, cette résistance diminue quand elles sont différenciées par du TPA (Rucks et

Olson, 2005). Les cellules eucaryotes en fonction du type cellulaire et de leur état de différenciation semblent posséder des caractéristiques ayant un rôle modulateur sur le système de sécrétion de type III (Rucks et al., 2003; Rucks et Olson, 2005).

- **Localisation subcellulaire d'ExoS**

Le domaine MLD (**M**embrane **L**ocalization **D**omain) (aa 51-72) de la toxine permet une localisation au niveau des membranes internes des cellules hôtes lorsque la toxine est sécrétée par la bactérie ou exprimée par des cellules eucaryotes (Pederson et al., 2000 ; Pederson et al., 2002).

L'absence de ce domaine n'affecte pas les effets morphologiques et la cytotoxicité de la toxine, par contre cette localisation est nécessaire pour le choix des protéines cibles (Pederson et al., 2002). Lorsque la toxine est exprimée par transfection dans cellules CHO (**C**hinese **H**amster **O**vary), des délétions dans les 78 premiers acides aminés de la partie N-terminale empêchent une localisation au niveau périnucléaire, suggérant que la partie N-terminale possède un domaine de localisation périnucléaire (Pederson et al., 2000). Les changements morphologiques des cellules et la cytotoxicité associés à ExoS sont indépendants de la localisation membranaire de la toxine (Pederson et al., 2002). En plus de sa localisation membranaire, ExoS pourrait être clivée dans la cellule et elle est retrouvée dans le cytoplasme, (Pederson et al., 2000). Certaines données de la littérature montrent que la forme cytoplasmique de la toxine est minoritaire comparée à la forme membranaire (Riese et Barbieri, 2002).

- **Fonction moléculaire d'ExoS**

- Domaine ADP-ribosyl transférase.

Le domaine ADP-ribosyl transférase est le premier domaine d'ExoS qui a été caractérisé. Il permet le transfert d'un résidu ADP-ribose sur un certain nombre de protéines eucaryotes.

L'activité du domaine ADP-ribosyl transférase nécessite la présence d'un facteur eucaryote endogène, FAS (Factor activating Exoenzymes) de la famille des 14-3-3, dont le rôle dans l'activation d'ExoS est mal compris. Des expériences ont montré que les protéines 14-3-3 interagissent *in vitro* et *in vivo* avec Raf et ExoS (Coburn et al., 1991; Fu et al., 1993; Zhang et al., 1997; Henriksson et al., 2000b).

La première cible du domaine ADPRT découverte *in vitro* a été la vimentine, un constituant des filaments intermédiaires (Coburn et al., 1989a). ExoSADPRT ADP-ribosyle surtout plusieurs GTPases de la famille Ras (Ras, Rab3, Rab4, Ral, Rap1A et Rap2) (Coburn et Gill, 1991; Coburn et al., 1989b).

L'ADP-ribosylation empêche l'activation de Ras et Rap1 en inhibant leur interaction avec leur facteur d'échange respectif Cdc25 (GEF guanine nucleotide exchange factor) et C3G (Riese et al., 2001). ExoSADPRT est capable d'ADP-ribosyler plusieurs Arginines sur la GTPase Ras (Arg 41, 135 et 128) (Ganesan et al., 1998; Ganesan et al., 1999). Dans la cellule, cette activité sur Ras nécessite la localisation membranaire de la toxine (Pederson et al., 2002; Riese et Barbieri, 2002).

ExoSADPRT agit différemment sur RalA en perturbant l'interaction entre RalA et son effecteur RalBP1 (Fraylick et al., 2002a).

Dans le milieu de culture des cellules CHO, ExoS est capable d'ajouter des résidus ADP-riboses indépendamment de la présence de FAS sur un certain nombre de protéines du sérum telles que les immunoglobulines G et l'alipoprotéine 1A (ApoA1) (Knight et Barbieri, 1997).

Dans la cellule, ExoSADPRT agit de manière séquentielle sur ces cibles qui varient légèrement en fonction de la lignée cellulaire utilisée. Globalement ses cibles privilégiées sont surtout Ras, puis les membres de la sous-famille Rab et Ral, ainsi que dans certains cas Rac1 et Cdc42 (Mcguffie et al., 1998; Fraylick et al., 2002b; Henriksson et al., 2002). L'effet d'ExoSADPRT sur les Rho GTPases Rac et Cdc42 est associé à une relocalisation membranaire de Rac1 et Cdc42 dans les cellules HT-29 (Fraylick et al., 2002b).

L'expression du domaine ADPRT dans la cellule peut avoir un effet cytotoxique sur la cellule (Frithz-Lindsten et al., 1997; Pederson et Barbieri, 1998; Radke et al., 1999; Henriksson et al., 2000b). Cet effet ne dépend pas forcément de l'ADP-ribosylation de Ras, puisqu'en absence du domaine MLD, l'ADP-ribosylation de Ras n'est plus possible, la toxine est pourtant toujours cytotoxique suggérant que cet effet serait lié à d'autres cibles d'ExoS dans ces conditions (Pederson et al., 2002; Riese et Barbieri, 2002). Son activité sur la GTPase peut être liée à une perturbation de la voie EGF (Epithelial Growth Factor)/Ras/Raf1/Akt *in vivo* dans les cellules HeLa et NIH3T3. L'injection d'ExoS dans la cellule par *Yersinia pseudotuberculosis* utilisée dans ces expériences comme bactérie sécrétrice, empêche la réponse des cellules à l'EGF (Henriksson et al., 2000a).

ExoSADPRT est capable d'inhiber l'endocytose en interagissant avec Rab5 (Barbieri et al., 2001). Le domaine ADPRT induit des changements morphologiques irréversibles des

cellules et il affecte la synthèse de l'ADN (Vincent et al., 1999; Fraylick et al., 2002b; Henriksson et al., 2002).

Récemment, il a aussi été montré qu'ExoSADPRT peut cibler des protéines de la famille des ERMs (**E**zrine, **R**adixine, **M**eoisine). Cette famille de protéine intervient dans la régulation du cytosquelette d'actine, ce qui induit des changements morphologiques et l'arrondissement des cellules HeLa (Maresso et al., 2004).

La souche bactérienne PAK, induit la mort par apoptose des cellules HeLa, cette mort dépend du domaine ADPRT et de l'activation de la voie des JNK/caspase-9/caspase-3 et de l'inhibition de la voie des p38MAPK (Mitogen activating protein kinase) (Kaufman et al., 2000; Jia et al., 2003).

○ Le domaine GAP d'ExoS

La fonction du domaine GAP a été découverte plus récemment. Il permet l'inhibition des GTPases de la famille Rho (i.e Rho, Rac et Cdc42) et de Rap1 (Goehring et al., 1999; Henriksson et al., 2002; Krall et al., 2002).

Le domaine GAP induit un changement morphologique des cellules épithéliales, un réarrangement du cytosquelette d'actine réversible et perturbe la formation des fibres de stress dépendante de RhoA (Fraylick et al., 2001; Goehring et al., 1999; Krall et al., 2002; Pederson et al., 1999). Cette inhibition des Rho GTPases par ExoSGAP induit une relocalisation cytoplasmique de Rac et Cdc42, en coopération avec Rho-GDI (**GDP Dissociation Inhibitor**) (Krall et al., 2002; Sun et Barbieri, 2004).

L'activité antiphagocytaire, cytotoxique et réorganisatrice du cytosquelette d'actine par le domaine N-terminal avait déjà été suggérée en utilisant *Yersinia* comme bactérie sécrétrice d'ExoS (Frithz-Lindsten et al., 1997). Récemment, des expériences sur des lignées murines de macrophages J774A.1 ont mis en évidence le rôle directement inhibiteur d'ExoSGAP sur la phagocytose des bactéries en perturbant par exemple la formation Rac1-dépendante des lamellipodes (Rocha et al., 2003). Le domaine ADPRT probablement par l'intermédiaire de Ral et Ras aurait dans ce cas là un rôle dans l'adhérence et la formation des filopodes (Rocha et al., 2003).

Il semble exister une régulation croisée des domaines fonctionnels d'ExoS. *In vitro* et *in vivo* le domaine GAP d'ExoS peut être ADP-ribosylé et inhibé par le domaine ExoSADPRT, cette ADP-ribosylation suggère une régulation de la fonction du domaine GAP par le domaine ADPRT (Riese et al., 2002). Des expériences en cellules HT-29 en utilisant des formes mutantes pour le domaine GAP et ADPRT ont montré que les effets du domaine

ADPRT sur la synthèse d'ADN et sur la morphologie cellulaire sont potentialisés par la présence d'un domaine GAP fonctionnel. Dans ces expériences, ExoSGAP affecte peu la réorganisation du cytosquelette d'actine et cet effet sur l'actine est réversible, au contraire de celui induit par ExoSADPRT (Fraylick et al., 2001).

○ Effet de la forme sécrétée d'ExoS

ExoS peut aussi être sécrétée dans le milieu extracellulaire où elle peut provoquer d'autres types de réponse cellulaire. ExoS dans ces cas là contribue à l'inflammation observée au cours des infections à *P. aeruginosa*. La toxine agit comme un mitogène pour les lymphocytes T humains et elle est un activateur des monocytes (macrophages). Elle induit aussi l'expression de cytokines et chimiokines par les cellules mononucléaires qui contribueraient à l'inflammation pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose (Mody et al., 1995 ; Bruno et al., 1998; Epelman et al., 2000; Epelman et al., 2002). ExoS active aussi les lymphocytes T qui prolifèrent légèrement et rentrent rapidement en apoptose (Mody et al., 1995; Bruno et al., 1998; Bruno et al., 2000).

Le mécanisme d'action de la forme extracellulaire d'ExoS commence à être mieux compris. ExoS, à la surface de la cellule, est capable d'interagir et d'activer les récepteurs TLRs (Toll Like Receptor) par une voie MyD88 dépendante, le domaine N-terminal interagit spécifiquement avec TLR4/MD2 et le domaine C-terminal avec TLR2. La forme extracellulaire d'ExoS peut être internalisée par les cellules THP-1 (cellules humaines de type promonocyte) ce qui pourrait agir sur la fonction de la cellule, bien que l'inhibition de l'internalisation n'ait pas d'effet sur la sécrétion de cytokines (Epelman et al., 2004).

➤ L'Exoenzyme T

L'exoenzyme T est une protéine bifonctionnelle de 53kDA qui possède 76% d'identité protéique avec ExoS. Le domaine ADPRT d'ExoT présente une activité FAS dépendante de 0,2 à 1% de celle observée avec ExoS (Yahr et al., 1996). ExoT, au contraire d'ExoS, n'est pas cytotoxique, suggérant qu'ExoT ne possède pas les mêmes cibles qu'ExoS. En effet, ExoT ADP-ribosyle Crk-I et Crk-II (CT10-regulator of kinase) *in vivo* et *in vitro* (Sun et Barbieri, 2003). Les protéines Crk sont impliquées dans la phagocytose associée aux intégrines et dans les adhésions focales. Elles sont, par exemple, impliquées dans l'activation de la mobilité cellulaire par association aux protéines ERMs et dans l'interaction avec Rho-GDI pour l'activation de RhoA (Tsuda et al., 2004).

Le domaine GAP possède les mêmes cibles qu'ExoSGAP *in vitro* : il inhibe la phagocytose par les cellules polarisées et les macrophages et il affecte la morphologie cellulaire (Sundin et al., 2001; Kazmierczak et Engel, 2002). Là encore, les effets sur la morphologie et le cytosquelette d'actine des cellules sont irréversibles quand ils sont associés au domaine ADPRT et réversibles quand ils sont liés au domaine GAP (Sundin et al., 2004). ExoT inhibe la réparation de l'épithélium pulmonaire *in vitro* (Geiser et al., 2001).

➤ L'Exoenzyme U

Cette toxine est responsable d'une cytotoxicité rapide sur les cellules en culture (Finck-Barbancon et al., 1997; Hauser et al., 1998). L'activité toxique de la toxine ExoU, dont la fonction a été découverte récemment, est inhibée par des inhibiteurs des phospholipases A2 (PLA2) dans les cellules de mammifère et de levure (Phillips et al., 2003; Sato et al., 2003). ExoU conduit à la mort des cellules par nécrose (Sato et al., 2003). L'activité PLA2 d'ExoU nécessite la présence d'un facteur cytosolique encore non identifié présent dans la cellule hôte (Sato et al., 2003; Tamura et al., 2004). ExoU possède aussi une activité de type lysophospholipase (Tamura et al., 2004). Dans une lignée de cellules épithéliales de poumon, ExoU induit la translocation nucléaire de Fos. Fos interagit avec Jun pour former le facteur de transcription dimérique AP-1. ExoU, par l'intermédiaire de AP-1 et probablement de voies MAPK, régule dans ces cellules l'expression de gènes cibles dont la GTPase RhoB, c-fos, l'interleukine pro-inflammatoire 6 (IL6) (McMorran et al., 2003).

➤ L'Exoenzyme Y

Il s'agit d'une adénylate cyclase de 48 kDa qui augmente la concentration en AMPc dans la cellule induisant un changement morphologique des cellules qui s'arrondissent. Son activation nécessite la présence d'un facteur eucaryote endogène (Yahr et al., 1998).

4. Les insectes comme modèles d'étude de la virulence de *P. aeruginosa*.

Aucun modèle animal disponible actuellement ne permet de reproduire tous les aspects des pathologies associées à *P. aeruginosa* et d'étudier l'ensemble des mécanismes de virulence de la bactérie. Il est possible de développer des modèles alternatifs pour l'étude de ces mécanismes de virulence et de leurs effets sur la réponse immunitaire de l'hôte.

P. aeruginosa est capable d'infecter de nombreux organismes en utilisant les mêmes facteurs de virulence (Rahme et al., 2000). Plusieurs études ont montré que les insectes étaient de bons modèles pour l'étude de ces facteurs de virulence (Erickson et al., 2004; Fauvarque et al., 2002; Mahajan-Miklos et al., 2000; Potvin et al., 2003).

a. *Galleria mellonella*

La souche PA14 qui exprime ExoU, ExoT mais pas ExoY, est capable d'infecter la larve de la mite *Galleria mellonella* (Jander et al., 2000; Hendrickson et al., 2001). Il existe une corrélation entre l'augmentation chez les larves de la dose létale à 50% et les effets observés sur les souris, lorsque les individus sont infectés par différentes souches mutantes de *P. aeruginosa* (Jander et al., 2000). *Galleria mellonella* est aussi un modèle d'étude des cytotoxines de type III. Une mutation du système de sécrétion de type III diminue la virulence de la bactérie dans cet hôte. La translocation d'une seule des toxines ExoU ou ExoT est suffisante pour avoir une virulence proche de la souche d'origine. En plus, il semble qu'une protéine non identifiée du système de sécrétion de type III participe à la virulence de la bactérie par rapport aux larves d'insectes et aux cellules CHO (Miyata et al., 2003).

b. *Drosophila melanogaster*

Plusieurs études ont montré que *D. melanogaster* pouvait servir de modèle d'étude des infections par *P. aeruginosa* (Boman et al., 1972; Lemaitre et al., 1997; D'argenio et al., 2001; Fauvarque et al., 2002).

- Un crible de 1 500 lignées mutantes de PAO1 a montré qu'un défaut dans la mobilité de type bactérienne affectait la capacité de la bactérie à tuer des mouches (D'argenio et al., 2001).
- La régulation du quorum sensing par QscR pour l'activation des systèmes de virulence joue un rôle important dans la pathogénicité bactérienne (Chugani et al., 2001).
- Le SSTT est activé au cours de l'infection et il est essentiel dans l'induction de la mort rapide des mouches adultes (Fauvarque et al., 2002).
- Les gènes de résistance à l'H₂O₂ interviennent dans la virulence. Un mutant de *P. aeruginosa* pour la catalase KatA présente une virulence atténuée par rapport aux souches avec une catalase fonctionnelle, chez la drosophile (Lee et al., 2005a). La protéine

OxyR impliquée dans la résistance au stress oxydant, participe à la virulence de *P. aeruginosa* chez la drosophile, chez les souris ou sur les neutrophiles humains (Lau et al., 2005).

Dans la drosophile, l'infection par *P. aeruginosa* par piqûre septique induit une réponse immunitaire et la synthèse de peptides antimicrobiens (Lemaitre et al., 1997; Fauvarque et al., 2002; Lau et al., 2003; Apidianakis et al., 2005). Il existe une grande variabilité de virulence entre les souches de *P. aeruginosa*. Différentes souches bactériennes ont été comparées pour leur pathogénicité chez la drosophile et il a été montré qu'elles tuaient les mouches avec une efficacité plus ou moins importante (Lau et al., 2003). La voie Toll et ses facteurs NF- κ B, Dif et Dorsal, ainsi que la voie Imd participent toutes deux et probablement en synergie à la réponse immunitaire en réponse à une infection par *P. aeruginosa* (Apidianakis et al., 2005; Lau et al., 2003).

Les toxines ExoS et ExoT affectent toutes deux le fonctionnement des Rho GTPases qui ont un rôle majeur dans la réponse immunitaire innée. Les Rho GTPases sont très conservées dans le règne animal où elles participent à la régulation de processus cellulaires communs aussi bien chez les mammifères que chez la drosophile. La contribution des toxines de type III dans la virulence bactérienne chez la drosophile (Fauvarque et al., 2002) et les résultats que nous avons obtenus (Voir partie résultats) suggèrent un rôle des Rho GTPases dans la réponse immunitaire innée de la mouche. Dans la partie suivante, je présenterai le rôle des Rho GTPase chez les mammifères.

II. Les Rho GTPases chez les mammifères

Les GTPases monomériques se regroupent en cinq familles : la famille des Ras, celle des Rho, celle des Rab, celle des Sar1/Arf et Ran (Fig. In. 5).

Les Rho GTPases sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires, comme le réarrangement du cytosquelette d'actine, la migration cellulaire, le trafic vésiculaire, la prolifération et l'adhésion cellulaire (Symons et Settleman, 2000). Dans la cellule, elles contrôlent de nombreuses voies de signalisation (Schwartz, 2004) (Fig. In. 8). Elles ont aussi un rôle dans la régulation de l'apoptose aussi bien à travers le contrôle de voies pro- ou anti-apoptotiques (Coleman et Olson, 2002).

Dans cette partie, je vais essentiellement présenter le rôle de trois des Rho GTPases, Rho, Rac, Cdc42 dans la réponse immunitaire innée.

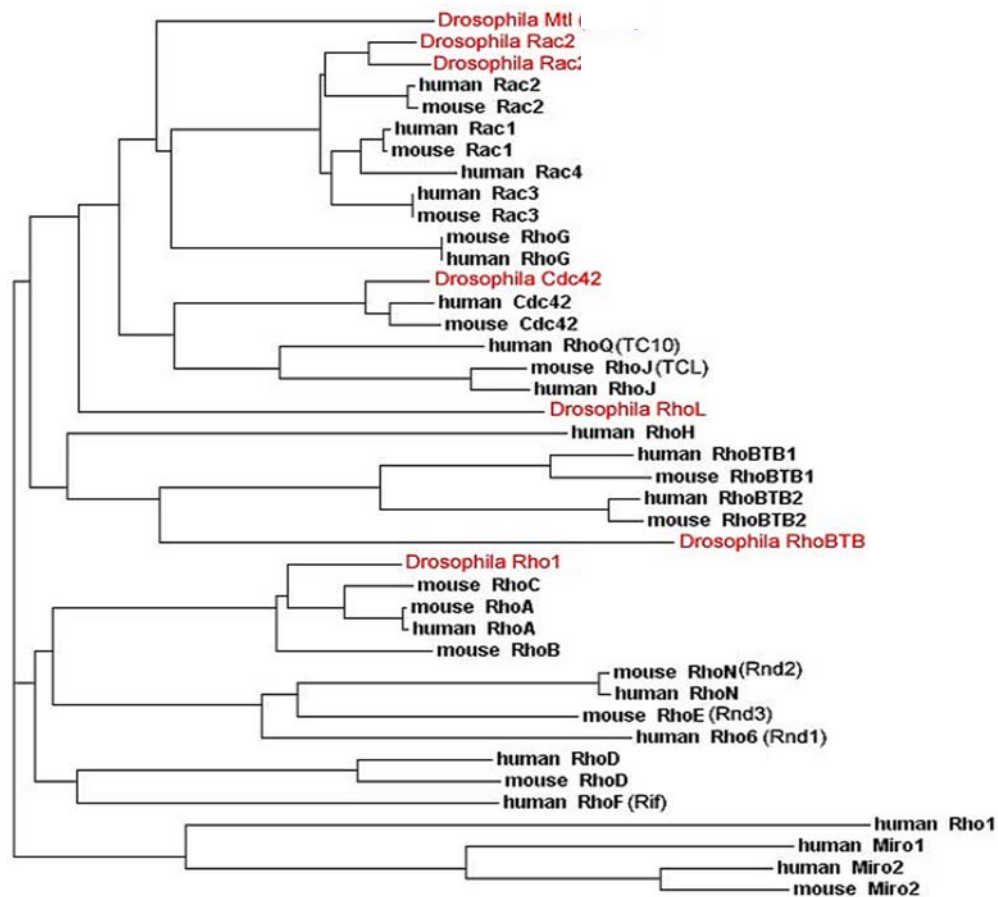


Figure In. 5 : Phylogénie des Rho GTPases des mammifères et de la drosophile (liste non exhaustive) (par clustlaw <http://align.genome.jp/>)

Les GTPases sont des protéines de 20 à 40 kDa capables de fixer le GTP (protéines G). Les protéines G sont très conservées au cours de l'évolution : elles possèdent 30 à 55 % d'homologie entre les espèces (Hall, 1990). Dans la famille des Rho GTPases des mammifères, on trouve différentes sous-classes parmi lesquelles : Rho (RhoA, RhoB, RhoC), RhoD (Rif, RhoD), RhoH, Rac (Rac1, 2, 3, RhoG) et Cdc42 (Cdc42, TCL, TC10), Rnd 1, 2, 3/RhoE. Il existe aussi un certain nombre de GTPases atypiques comme Chp et Wrch, proches de Cdc42, ainsi que RhoBTB 1 et 2 et Miro 1 et 2 (Fig. In.5) (Wennerberg et Der, 2004).

Les GTPases peuvent subir des modifications post-traductionnelles qui vont leur permettre d'avoir une activité maximale. Par exemple, les Rho GTPases aussi bien que les Ras et Rab possèdent en C-terminal une séquence CAAX (C : cystéine, A : acide aminé aliphatique, X : n'importe quel acide aminé), où l'acide aminé X conditionne le type de motifs lipidiques ajoutés qui peuvent être le farnésyl, le géranylgeranyl ou encore le palmitoyl. Ces modifications sont nécessaires au ciblage membranaire de la protéine (Takai et al., 2001).

1. Cycle et régulation des Rho GTPases

a. Cycle des GTPases monomériques

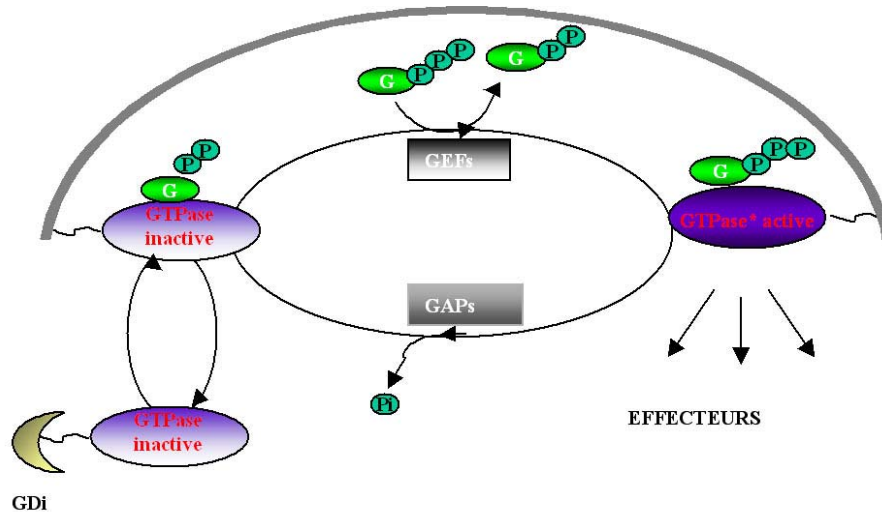


Figure In. 6 : Cycle d'activation/inactivation des Rho GTPases monomériques

Les GTPases sont activées par échange du GDP par du GTP. Cet échange est facilité par les GEFs. L'hydrolyse du GTP est catalysée par les protéines GAPs. Les GTPases liées au GDP peuvent aussi être maintenues à l'état inactif dans le cytoplasme grâce aux GDIs qui se lient au motif lipidique ajouté après la traduction.

Les GTPases monomériques agissent au sein de la cellule comme de véritables interrupteurs moléculaires. Elles oscillent entre deux formes, une forme active liant le GTP (Guanosine Tri Phosphate) et une forme inactive liant le GDP (Guanosine Di Phosphate). L'activation se fait par échange du GDP par du GTP, ce qui va induire des changements conformationnels qui vont permettre la liaison aux effecteurs et l'activation de la signalisation en aval des GTPases. Les GTPases monomériques possèdent une activité GTPases intrinsèque qui permet l'hydrolyse du GTP en GDP et qui est en général faible (Fig. In.6) (Hall, 1990).

b. Régulation des GTPases monomériques

➤ Les GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factor) : facteurs d'échange

La régulation des GTPases dépend de protéines GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factor) qui vont permettre l'échange du GDP par du GTP. Les GEFs facilitent la libération du GDP et stabilisent l'état de transition de la GTPase sans nucléotide, facilitant ainsi l'association avec le GTP. La fixation du GTP va conduire à la dissociation de la GEF de la GTPase. Les GEFs sont finement régulées par des signaux intracellulaires ou extracellulaires

qui permettent leur translocation à proximité des GTPases cibles. Les signaux en amont des GTPases sont importants dans le choix de la GEFs et dans le choix des processus moléculaires contrôlés par les GTPases (Takai et al., 2001). Il existe toute une palette de GEFs qui ont chacune des GTPases cibles bien précises.

➤ **Les GAPs (GTPase Activating Protein) : inhibiteurs des GTPases monomériques**

L'activité GTPasique intrinsèque est généralement faible, elle est stimulée par des protéines de type GAP (GTPase Activating Protein) (Gideon et al., 1992; Lamarche et Hall, 1994). Chaque famille de GTPases possède ses propres GAPs. Les GAPs possèdent plusieurs domaines en plus de celui nécessaire à sa fonction GAP, certaines possèdent des domaines d'interaction avec d'autres protéines ou des domaines de liaison aux lipides pouvant intervenir dans la relocalisation membranaire. Les GAPs oscillent entre une localisation membranaire et cytosolique, régulant leur activité sur les GTPases monomériques (Lamarche et Hall, 1994). Il existe un équilibre permanent dans la cellule entre le pool de GTPases lié au GTP et celui lié au GDP, cette balance dépendant des GAPs et GEFs.

Les GAPs seraient aussi des effecteurs de la signalisation en aval des GTPases et pourraient donc avoir un rôle dans le choix des voies de signalisation en aval des GTPases (Jullien-Flores et al., 1995; Kozma et al., 1996). Par exemple, l'interaction de Rac et Cdc42 avec la RhoGAP n-chimérine, indépendamment de son activité GAP, est nécessaire et suffisante pour induire la formation des lamellipodes et filopodes. Dans ces cas là, c'est la localisation cellulaire du complexe Rho/GAP qui semble importante (Kozma et al., 1996).

➤ **GDI : GDP Dissociation Inhibitor**

Les Rho GTPases peuvent aussi être retrouvées dans le cytoplasme de la cellule sous forme inactive en complexe avec les protéines GDIs. Ces dernières interviennent dans la régulation des mouvements des GTPases entre le cytosol et les membranes et elles maintiennent les GTPases inactives sous forme soluble. L'association des GTPases et des GDIs est régulée et dépend des facteurs qui peuvent être des protéines comme les ERMs et Crk, des lipides et des phosphorylations (Di-Poi et al., 2001; Dermardirossian et Bokoch, 2005). Les GDIs interviennent dans le contrôle des différents processus cellulaires comme l'exocytose et dans la régulation de la NADPH-oxydase par Rac (Di-Poi et al., 2001).

2. Fonction des Rho GTPases

a. Les Rho GTPases et cytosquelette

Le cytosquelette d'actine est composé de filaments d'actine (F-actine) et de nombreuses autres protéines permettant la structuration et la régulation de ce cytosquelette. Chacune des Rho GTPases contrôle des changements spécifiques dans la forme cellulaire et dans l'organisation du cytosquelette d'actine en réponse aux différents stimuli extracellulaires (Fig In.7). L'activation de Cdc42 permet la formation de protusions comme les microvillosités et les filopodes qui sont de minces prolongements membranaires composés de filaments d'actine dirigés dans le sens de l'extension. Ces extensions permettent de sentir le milieu extracellulaire. Rac est impliquée dans la formation des structures permettant la migration cellulaire notamment les lamellipodes, pseudopodes et les replis membranaires ("membranes ruffles") qui correspondent au reflux des lamellipodes à l'arrière. Rho intervient dans la formation des fibres de stress, qui sont de longs faisceaux d'actine qui permettent l'attachement à la matrice extracellulaire via les adhésions focales. Rho a aussi un rôle dans la contractilité cellulaire à travers la formation des filaments contractiles actine/myosine (Hall, 1998; Nobes et Hall, 1999; Hall et Nobes, 2000).

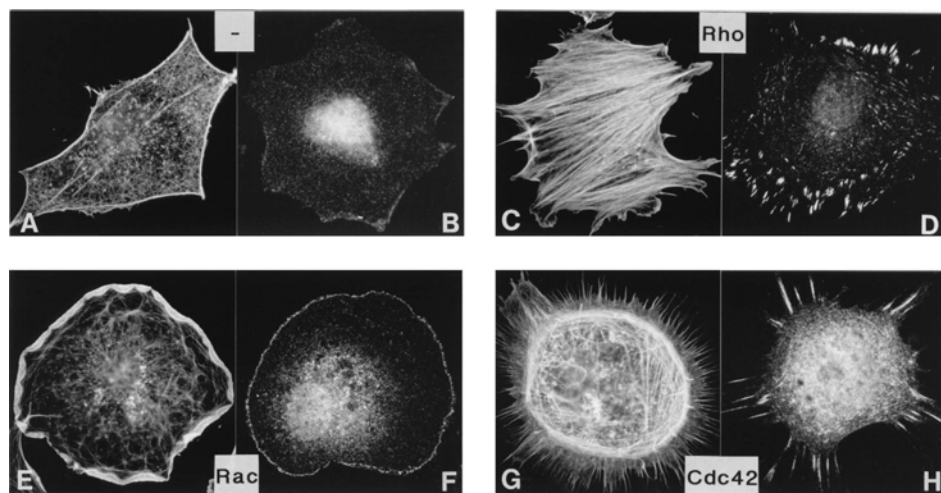


Figure In. 7 : Rho, Rac et Cdc42 contrôlent l'assemblage et l'organisation du cytosquelette d'actine d'après Hall, 1998.

A, C, D, G : marquage de l'actine avec de la phalloïdine-rhodamine dans des fibroblastes "swiss 3T3".

B, D, F, H : marquage des complexes d'adhésion contenant des intégrines par immunofluorescence contre la vinculine.

A, B : cellules quiescentes, l'actine est peu organisée et il y a peu d'adhésions focales. C, D : l'ajout du facteur de croissance, l'acide lysophosphatidique, active Rho et induit la formation de fibres de stress et de d'adhésion focale (D). E, F : la micro-injection de Rac induit la formation de lamellipodes (E) et de complexes d'adhésion focale (F), G, H : l'injection d'un facteur d'échange de Cdc42, FG1, induit la formation de filopodes et des complexes d'adhésion.

En plus du rôle des GTPases décrit précédemment, les Rho GTPases participent à la formation des jonctions complexes par les cadhérines et elles ont aussi un rôle dans la régulation de l'adhésion des cellules dépendantes des intégrines (Hall, 1998; Fukata et Kaibuchi, 2001).

Les Rho GTPases répondent indépendamment à différents stimuli, mais il existe une inter-régulation des GTPases entre elles, Cdc42 serait capable d'activer Rac qui agirait sur Rho, mais cette hiérarchie semble dépendre du type cellulaire considéré (Nobes et Hall, 1995; Kozma et al., 1997; Hall, 1998).

b. Voies de signalisation impliquant les Rho GTPases

Les Rho GTPases régulent un grand nombre de voies de signalisation : certaines de ces interactions pourraient avoir un rôle plus ou moins direct dans la réponse immunitaire (Fig. In.8). Les Rho GTPases sont notamment activées par des facteurs de croissance, par des molécules inflammatoires et par des récepteurs aux pathogènes. Les GTPases monomériques sont capables d'activer des voies de signalisation dont les voies des JNK et p38MAPK en réponse au stress permettant ainsi l'expression de gènes de la réponse immunitaire (Bishop et Hall, 2000; Schwartz, 2004).

Rho permet entre autre l'activation de la kinase ROK, qui phosphoryle de nombreuses protéines de régulation du cytosquelette d'actine dont la LIM kinase (LIMK) et phosphoryle la MLC kinase (**M**ynosin **L**ight **C**hain **K**inase) pour diminuer la contraction de l'actomyosine. La LIMK inhibe la cofiline, une protéine qui fragmente l'actine polymérisée et qui stabilise ainsi les filaments d'actine (Maekawa et al., 1999). Rac et Cdc42 contrôlent le cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de la PI3K (**P**hosphatidylinositol **3**-**K**inase) et des sérine/thréonine kinases PAK (**p**21-**A**ctivated **K**inase), cette dernière pouvant activer les LIM kinases (Edwards et al., 1999; Srinivasan et al., 2003). Rac et Cdc42 agissent sur des protéines de la famille WASP (**W**iskott **A**ldrich **S**yndrom **P**rotein), WAVE et WASP respectivement, qui peuvent lier le complexe Arp2/3 permettant la nucléation et la polymérisation de l'actine (Thrasher, 2002).

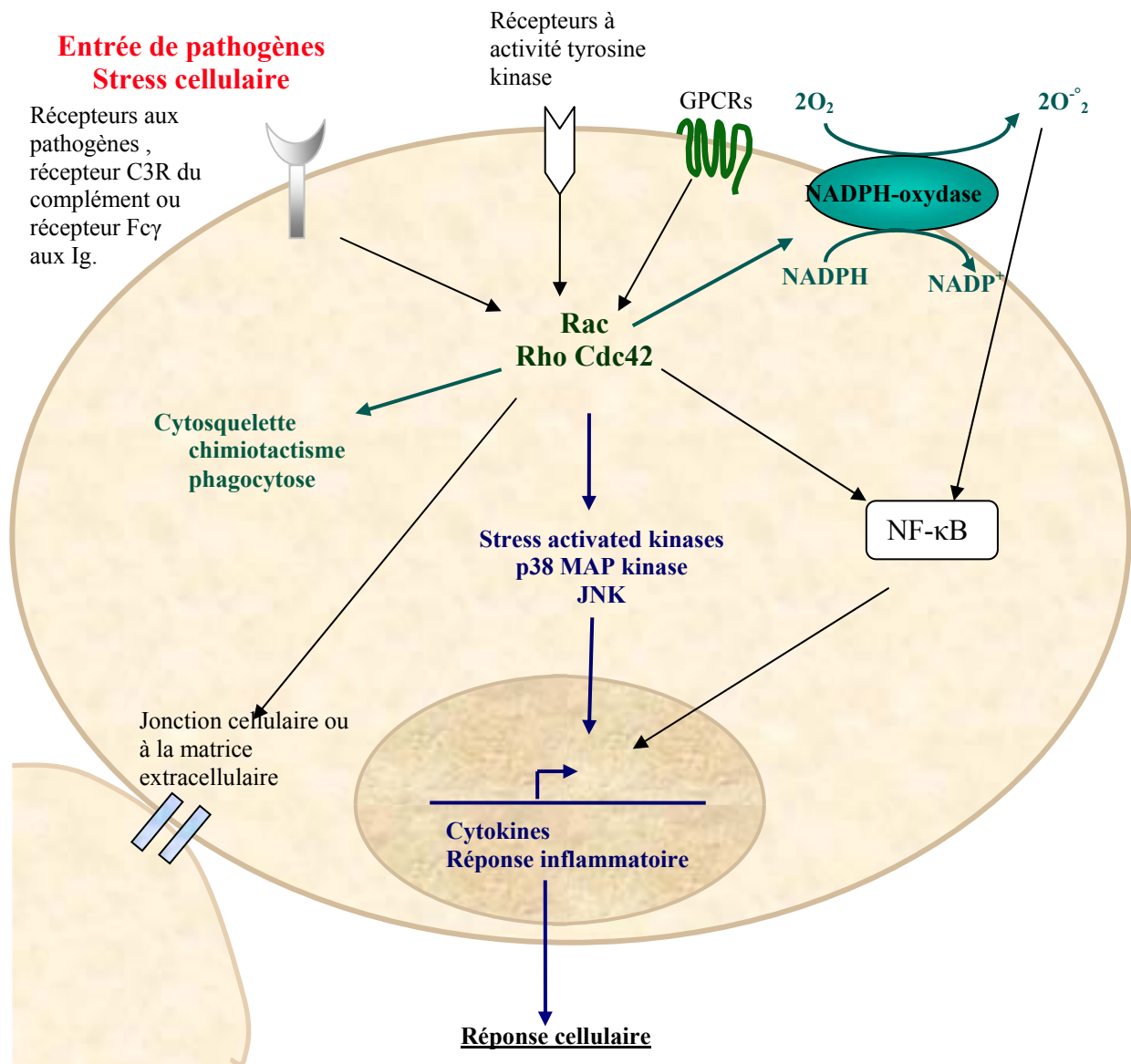


Figure In. 8 : Modèle simplifié des voies de signalisation impliquant les Rho GTPases et des processus cellulaires contrôlés par les Rho GTPases.

Les Rho GTPases contrôlent les réarrangements du cytosquelette d'actine, la NADPH-oxydase et des voies de réponse au stress p38MAPK et JNK. GPCR (**G** Protein-Coupled **R**eceptors) : récepteur couplé aux protéines G hétérotrimériques

3. Rôle des GTPases dans la réponse immunitaire innée chez les mammifères

Chez les mammifères, la réponse immunitaire innée dépend de la capacité des macrophages, des polymorphonucléaires (neutrophiles, basophiles et éosinophiles) et des cellules dendritiques à reconnaître les pathogènes à travers les récepteurs de surface. Cette reconnaissance permet la production de cytokines participant à l'inflammation et à la mise en

place d'une réponse immunitaire adaptée. Les pathogènes sont aussi phagocytés et détruits grâce à la libération d'enzymes et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Les leucocytes circulants répondent aussi aux chimioattractants et aux cytokines produits au cours de l'infection ce qui entraîne une modification de leur capacité d'adhésion et des réarrangements de leur cytosquelette d'actine, pour permettre leur migration sur les sites de l'inflammation et le franchissement des barrières épithéliales par extravasation. Tous ces processus doivent être finement régulés et coordonnés afin d'avoir une réponse efficace : les Rho GTPases y tiennent un rôle majeur, en participant à la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine au cours de la phagocytose et de la migration cellulaire, ainsi qu'en contrôlant l'activation de la NADPH-oxydase pour la production d'espèces réactives de l'oxygène (Bokoch, 2005).

Les Rho GTPases Rho (RhoA, RhoB, RhoC), Rac1 et Cdc42 sont présentes dans l'ensemble des cellules de l'organisme, alors que l'expression de Rac2 est restreinte aux cellules de la lignée hématopoïétique.

a. Chimiotactisme et migration cellulaire

Certaines chimiokines produites par les cellules (cellules endothéliales, macrophages, monocytes, fibroblastes) ou des produits bactériens comme par exemple le C5a ou fMLP (formyl Methionin Leucine Phenylalanine) vont former un gradient qui va induire la polarisation et la migration des leucocytes (Cicchetti et al., 2002). Ces molécules sont en général reconnues par des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques à la surface des cellules, ce qui va induire des changements morphologiques et la réorganisation du cytosquelette d'actine : l'actine polymérisée s'accumule notamment au niveau du front de migration (Fig In.9).

La régulation de la migration cellulaire dépend de l'activité coordonnée dans le temps et dans l'espace des trois Rho GTPases et dépend de l'activité de la PI3K. Cette régulation par la PI3K est complexe, les Rho GTPases sont en partie activées par la PI3K, dont l'activité et la localisation peut elle-même être régulée par Rac et Cdc42 respectivement (Srinivasan et al., 2003; Wu, 2005). Cette régulation croisée est importante dans le contrôle de la migration cellulaire.

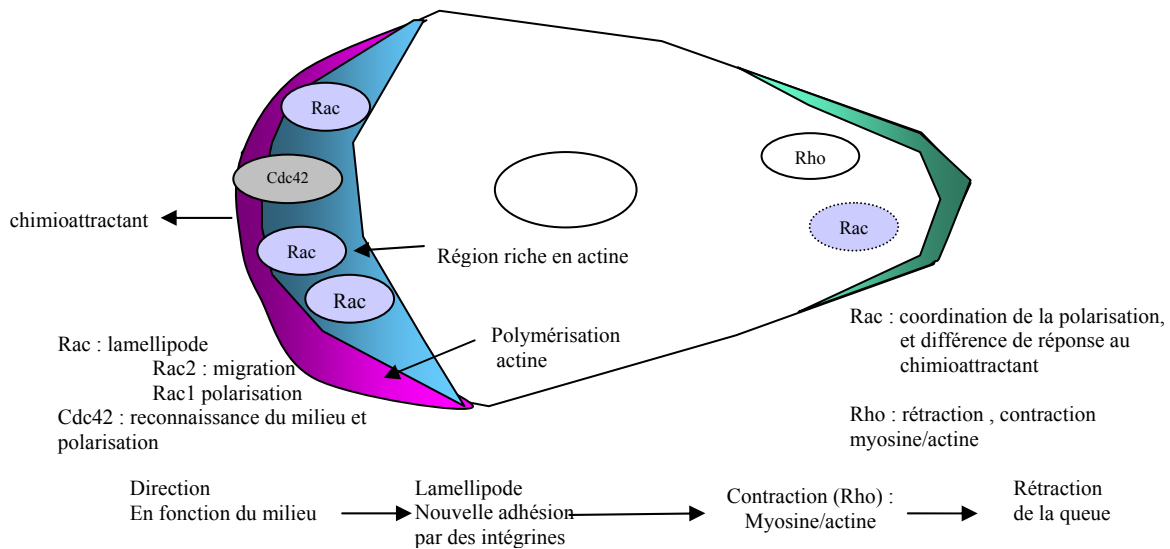


Figure In. 9 : Régulation du chimiotactisme par les Rho GTPases et leur localisation cellulaire

Au niveau du front de migration les Rac sont nécessaires à la formation des lamellipodes, Rac2 étant nécessaire à la migration et Rac1 ayant un rôle dans la polarisation cellulaire. Cdc42 intervient dans la reconnaissance du milieu et dans la polarisation de la cellule. Au niveau de la queue de rétraction, Rho est nécessaire au mécanisme de rétraction et de contraction actine /myosine. Rac2 est aussi faiblement activée à ce niveau et participe à la rétraction.

- La protéine Cdc42 intervient dans la polarisation cellulaire et dans la reconnaissance (sensing) du gradient de chimioattractants, la formation des filopodes (Allen et al., 1998). Elle aurait aussi un rôle dans le nombre et la stabilité des lamellipodes et dans la localisation et la stabilité du PI(3,4,5)P₃ au niveau du front de migration (Srinivasan et al., 2003).

- La protéine Rho est requise pour permettre d'induire les forces de rétraction et de contraction au niveau de la queue de rétraction des neutrophiles et des monocytes. RhoA permet notamment l'activation de la Rho kinase qui phosphoryle la chaîne légère de la myosine et inhibe la phosphatase MLCP (Myosin Light Chain Phosphatase). La phosphorylation de la MLCP permet l'activation de la myosine ATPase et la contraction actine/myosine (Raftopoulou et Hall, 2004).

- La protéine Rac est requise à l'avant de la cellule pour permettre la polymérisation du cytosquelette d'actine et pour induire la formation des protusions membranaires telles que les lamellipodes, la formation des complexes d'adhésion liés aux intégrines (Gu et al., 2003).

➤ **Rac1 et Rac2 sont nécessaires à la migration des leucocytes**

Chez l'homme, un individu atteint d'un syndrome d'immunodéficience ayant une mutation dans le gène *Rac2* souffre d'infections récurrentes et présente un défaut des migrations des neutrophiles (Ambruso et al., 2000; Williams et al., 2000; Gu et Williams, 2002).

Chez les souris mutantes *Rac2*^{-/-}, les neutrophiles montrent une migration réduite en réponse aux chimioattractants ainsi que des défauts de dégranulation (Li et al., 2002; Roberts et al., 1999). *In vivo*, les neutrophiles et les macrophages sont moins nombreux sur les sites d'infection (Roberts et al., 1999; Yamauchi et al., 2004). Ces défauts de migration ne sont pas liés à un défaut d'orientation des cellules dans le gradient de chimioattractants (Sun et al., 2004).

Les souris mutantes *Rac1*^{-/-} meurent rapidement au cours du développement, il a donc été créé des lignées murines transgéniques permettant un knock-out conditionnel du gène grâce au système Cre-Lox. Dans les monocytes, la déficience *Rac1*^{-/-} est à l'origine d'un défaut d'étalement et de repli membranaire des cellules, mais leur migration n'est pas modifiée en réponse à un chimioattractant tel que le M-CSF (**M**acrophage **C**olony-**S**timulating **F**actor) (Wells et al., 2004).

Rac1 n'aurait pas un rôle majeur dans la migration cellulaire, au contraire de Rac2. Elle serait impliquée dans la reconnaissance du milieu, dans la polarisation de la cellule par rapport au gradient de chimioattractants et dans la potentialisation de l'activité de Rac2 (Glogauer et al., 2003; Sun et al., 2004).

b. Rôle des Rho GTPases dans la phagocytose

Les neutrophiles, macrophages et les cellules dendritiques sont des cellules capables de phagocyter des pathogènes ce qui nécessite une régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine notamment par les Rho GTPases (Chimini et Chavrier, 2000).

La phagocytose dépend d'abord de la reconnaissance des pathogènes. Il existe des récepteurs qui reconnaissent des motifs microbiens associés aux pathogènes et qui participent à la régulation de la phagocytose (Stuart et Ezekowitz, 2005). Par exemple, certaines protéines de la famille des lectines reconnaissent des motifs carbohydrates à la surface des agents infectieux, comme le récepteur membranaire à mannose des macrophages (MMR) de

la famille des lectines C. La protéine à domaine lectine circulante MBL (**M**annose **B**inding **L**ectin), un composant du système du complément, participe à la phagocytose (Jack et al., 2005; Stuart et Ezekowitz, 2005). Cette reconnaissance va conduire à des modifications du cytosquelette d'actine puis à l'internalisation et à la destruction du pathogène dans le phagolysosome.

Il existe deux types de phagocytose dont la régulation par les Rho GTPases a été particulièrement étudiée (Caron et Hall, 1998). La phagocytose associée à l'opsonisation des pathogènes par les molécules C3 du complément dépend de Rho (Caron et Hall, 1998; Chimini et Chavrier, 2000). La phagocytose par reconnaissance des immunoglobulines (Ig) par les récepteurs Fc γ dépend quant à elle de Rac et Cdc42 et permet aussi l'activation de la NADPH-oxydase.

- La phagocytose couplée au complément dépend de la polymérisation de l'actine au site d'ingestion. Les bactéries opsonisées par les molécules C3b du complément sont reconnues par le récepteur CR1 et les intégrines de basse affinité CR3 et CR4. Ces deux dernières sont ensuite activées. L'activation du CR3 permet l'induction de Rho, ce qui va conduire au recrutement et à l'activation de la myosine, ainsi qu'au recrutement de la protéine Arp2/3 et de l'actine. Le remodelage du cytosquelette au cours de ce processus est à l'origine de la phagocytose (Caron et Hall, 1998; Aderem et Underhill, 1999; Olazabal et al., 2002).

- Dans le cas de la phagocytose associée Fc γ R, la reconnaissance et l'activation passent par l'activation de tyrosine kinase phosphorylant les récepteurs sur des motifs ITAMs (**I**mmunoreceptor **T**yrosine-based **A**ctivation **M**otif). Cela va conduire à l'activation de Rac par l'intermédiaire de sa GEF (Vav) et Cdc42 par l'intermédiaire d'une protéine GEF encore non identifiée (Patel et al., 2002). Les deux GTPases ont des rôles distincts dans la cellule : Cdc42 contrôle la formation des pseudopodes alors que Rac est impliquée dans la fermeture de la coupe de phagocytose et dans l'activation de la NADPH-oxydase (Massol et al., 1998). Au cours de la phagocytose, il existe une régulation spatiale et temporelle précise de l'activité des différentes Rho GTPases lors de la formation de la coupe et de la vacuole de phagocytose (Fig. In.10).

Figure In. 10 : Expériences de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) permettant de suivre la localisation de l'activité des Rho GTPases au cours de la phagocytose dépendante du récepteur FcγR. Time = temps en minute (Scott et al., 2004).

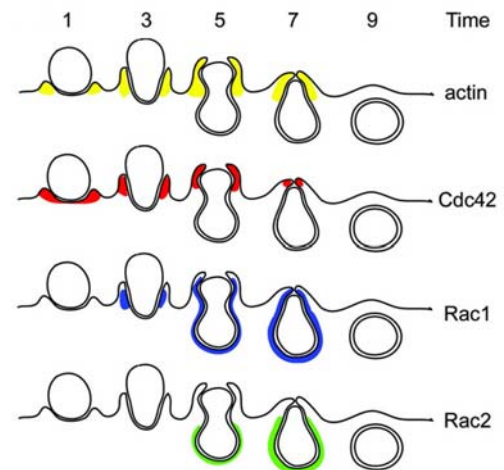
Actine active (polymérisation) en jaune au niveau des pseudopodes.

Les trois GTPases sont présentes à l'état inactif au niveau de la coupe de phagocytose, elles sont activées de manière précise au cours de la formation de la vacuole de phagocytose.

Activité de cdc42 (en rouge) : Elle est activée précocement au niveau des pseudopodes et permet probablement le recrutement de l'actine.

Activité de Rac1 (en bleu) : elle est activée au niveau de la coupe de phagocytose et plus faiblement dans les pseudopodes

Activité de Rac2 (en vert) : cette GTPase est présente au niveau de la coupe de phagocytose et au cours de la fermeture de la vacuole.



c. Les Rho GTPases dans la signalisation dépendante de NF-κB et par les récepteurs Toll-like (TLRs).

Les protéines de la famille Rel/NF-κB sont des facteurs de transcription dimériques, conservés dans le règne animal. Elles jouent un rôle important dans la réponse inflammatoire et la production de cytokines. Les protéines de type NF-κB sont activées par de nombreuses voies de signalisation dont celles en aval des récepteurs Toll-like (TLR : Toll-Like Receptor) chez les mammifères et les voies du TNF (Silverman et Maniatis, 2001). Leur activation peut aussi dépendre des GTPases de la famille Ras et de la famille Rho (Perona et al., 1997; Montaner et al., 1998). En absence de toute stimulation, les facteurs de transcription NF-κB sont maintenus à l'état inactif dans le cytoplasme soit par un domaine d'autoinhibition riche en répétitions ankirynes ou par interaction avec la protéine inhibitrice I-κB (Silverman et Maniatis, 2001). Son activation dépend d'un complexe IKK (I-κB kinase) qui permet la phosphorylation de Iκ-B et la libération du facteur NF-κB qui peut alors induire l'expression de nombreux gènes cibles.

➤ Régulation de NF-κB par les Rho GTPases

Dans les cellules NIH-3T3, la surexpression des différentes Rho, Rho, Rac, Cdc42, active la transcription dépendante de NF-κB d'un gène rapporteur. Cette activation dépend de la phosphorylation de I-κBα. Dans ces cellules, l'activation de NF-κB par Rho et Cdc42 peut être stimulée par du TNF (Perona et al., 1997; Montaner et al., 1998). L'activation de NF-κB par les Rho GTPases dépend de deux mécanismes distincts : Rac permet une activation

IKK-dépendante, tandis que Rho et Cdc42 interviendraient dans des mécanismes IKK-indépendants encore mal définis (Cammarano et Minden, 2001).

➤ **Les Rho GTPases dans la signalisation en aval des récepteurs Toll-Like (TLR)**

Les récepteurs Toll-Like, chez les mammifères, sont notamment présents à la surface des leucocytes et ont un rôle important dans la réponse immunitaire. Leur activation permet l'activation de plusieurs voies de signalisation : il existe une voie de signalisation dépendante de MyD88/ NF- κ B pour activer la transcription de cytokines et une voie indépendante de MyD88 pour à l'activation de IRF3 (Interferon-regulatory factor 3) et de la transcription de gènes dont IP-10 (Kawai et al., 2001). Les TLRs ne sont pas des récepteurs de phagocytose, mais certains sont présents dans le compartiment phagocytaire, où ils permettent l'activation des voies de signalisation. Par exemple, le TLR4 impliqué dans la reconnaissance du LPS, est retrouvé à la base de la synapse de phagocytose. La fonction des récepteurs Toll dans la réponse immunitaire ne dépendrait pas uniquement d'une combinaison entre eux mais aussi d'une synergie avec d'autres récepteurs aux pathogènes et des récepteurs de phagocytose (Stuart et Ezekowitz, 2005).

Différentes données de la littérature ont mis en évidence un rôle des Rho GTPases dans la signalisation en aval des TLRs.

- Le récepteur TLR2 en réponse à une stimulation par la bactérie *S. aureus* tuée, induit l'activation du facteur NF- κ B par deux voies dépendantes soit de MyD88 soit de Rac1 (Arbibe et al., 2000). La voie dépendante de Rac1 implique la formation d'un complexe avec le TLR2 et l'activation de la voie PI3K/Akt. De la même manière, Rac1 est impliquée dans la signalisation par le TLR4 (Equils et al., 2004).
- RhoA, permet en aval du TLR2, l'activation d'une PKC (**Protéine Kinase C**) atypique qui en phosphorylant la sous-unité de p65 de NF- κ B, permet l'activation du facteur de transcription indépendamment de la dégradation de son inhibiteur I- κ B (Teusch et al., 2004).

d. Régulation de la NADPH-oxydase NOX2 par les Rho GTPases

Les espèces réactives de l'oxygène participent à la réponse immunitaire et inflammatoire, les ions superoxydes sont notamment produits par la NADPH-oxydase.

La première **NADPH-oxydase** (NOX) décrite et la mieux caractérisée est celle présente au niveau des cellules phagocytaires, il s'agit de la NADPH-oxydase gp91phox ou NOX2. Elle est activée par des pathogènes ou par des molécules inflammatoires. Les ions superoxydes produits vont aboutir par réactions successives à la production d'acide hypochlorique (eau de javel) qui est hautement toxique (Fig. In.11). Dans les neutrophiles, l'acide hypochlorique synthétisé dépend de l'activité de la myéloperoxydase (Lambeth, 2004).

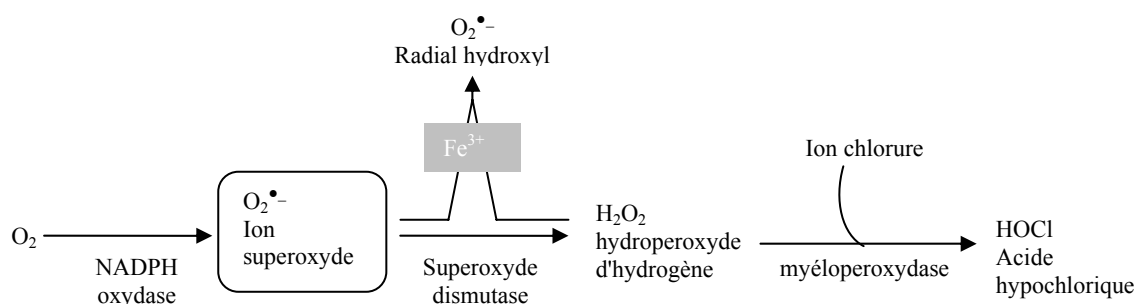


Figure In. 11 : Synthèse des espèces réactives de l'oxygène et de l'acide hypochlorique

Il existe d'autres protéines capables de produire des ions superoxydes qui sont NOX1, 3, 4 et 5 ainsi que les protéines DUOX (**D**ual **O**xidase 1 et 2). Ces dernières possèdent deux domaines fonctionnels, un domaine peroxydase en N-terminal et une fonction NADPH-oxydase dans la partie C-terminale. Ces différentes NADPH-oxydases n'ont pas la même localisation tissulaire que NOX2 (Tab. In.1), elles ont aussi des rôles différents, elles sont, par exemple, impliquées dans l'activation de voies de signalisation, dans la prolifération et la mort cellulaire (Lambeth, 2004). La localisation de certaines d'entre elles au niveau d'épithélia suggère un rôle de ces enzymes dans les mécanismes de défense (Werner, 2004).

Tableau In. 1 : Localisation cellulaires des différentes NOX/DUOX des mammifères d'après Lambeth (2004)

Enzymes	Sites principaux d'expression	Régulateurs connus
gp91phox (Nox2)	Cellules phagocytaires	P47phox, P67phox, P40phox, Rac1 et Rac2
NOX1	Inductible : colon, muscles lisses vasculaires	NOXO1, NOXA1, p22phox
NOX3	Rein fœtal	ND
NOX4	Rein, ostéoclastes, ovaire, œil	ND
NOX5	Ratte, sperme, glandes mammaires, cerveau	Calcium
DUOX1	Thyroïde, cervelet, poumons	Calcium
DUOX2	Thyroïde, colon, pancréas, prostate	Calcium

NOXO, NOXA1 : NOX organiser

➤ Activation de la NADPH oxydase

Le domaine catalytique de la NADPH-oxydase 2, est composé de deux sous-unités, la sous-unité gp91phox et la sous-unité p22phox qui correspond à une flavocytochrome b558. La protéine gp91phox, une protéine à 6 domaines transmembranaires de type ferrique-réductase à noyau hème, elle possède un domaine de liaison au FAD et au NADPH. La sous-unité p22phox est une protéine transmembranaire associée à gp91phox nécessaire à sa fonction dans les neutrophiles (Lambeth, 2004).

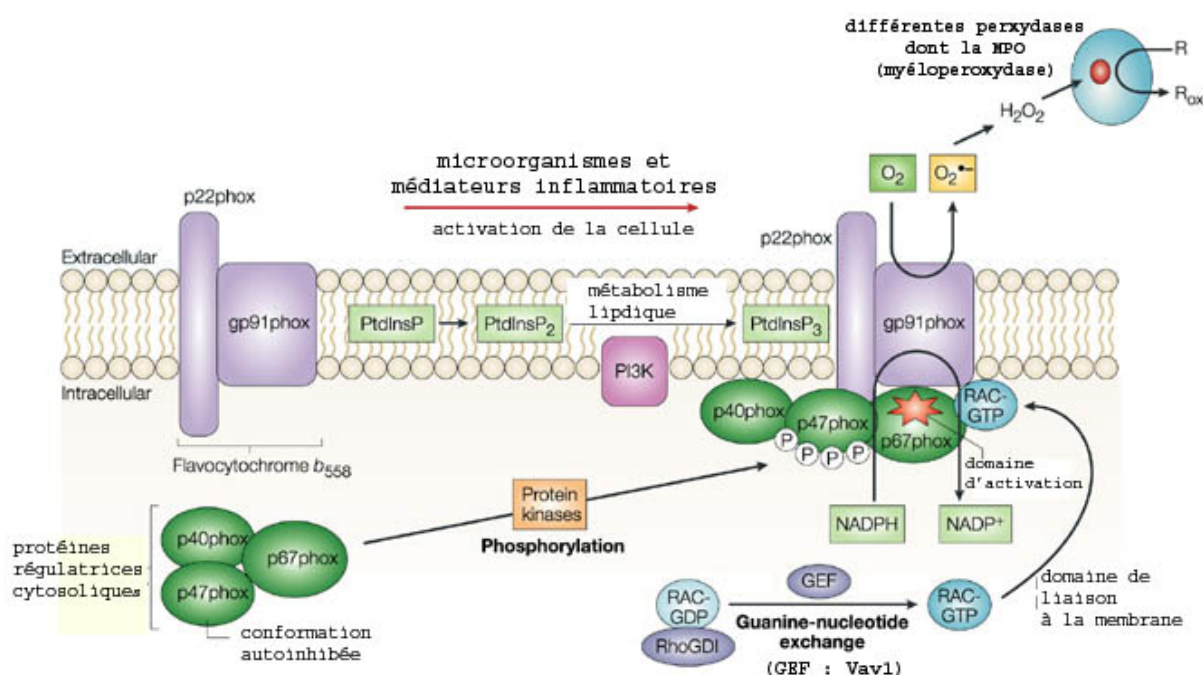


Figure In. 12 : Activation de la NADPH-oxydase Nox2 d'après d'après Lambeth (2005).

L'activation de la NADPH-oxydase résulte du regroupement à la membrane des sous-unités membranaires (gp91phox/p22phox), des sous-unités cytosoliques (p40phox/47phox/p67phox) et de Rac2. Cette activation dépend de protéines kinases dont la PKC (Protéine Kinase C) et Akt et d'enzymes du métabolisme lipidique dont la PI3K. L'activation de Rac dépend d'un facteur d'échange qui pourrait être Vav1. En absence de stimulation Rac est maintenue à l'état inactif dans le cytosol en complexe avec GDI.

En absence de stimulation, les protéines régulatrices p40phox, p47phox et p67phox sont en complexe dans le cytoplasme de la cellule sous une forme auto-inhibée. La GTPase Rac est aussi présente dans le cytoplasme sous forme inactive complexée à RhoGDI (Fig. In.12).

Après stimulation, les facteurs cytosoliques par l'intermédiaire de p47phox et Rac sont relocalisés à la membrane. Les différentes formes du PIP (Phosphatidyl Inositol Phosphate), le cytosquelette et les phosphorylations de p47phox participent à la translocation des facteurs cytosoliques à la membrane. p47phox va alors s'associer à p22phox par l'intermédiaire d'un

domaine SH3. Rac migre indépendamment des autres facteurs cytosoliques et se lie au flavocytochrome b558 permettant l'activation de p67Phox et donc de la NADPH-oxydase (Lambeth, 2004).

➤ **Rac dans l'activation de la NADPH-oxydase**

Les neutrophiles et macrophages expriment constitutivement Rac1 et Rac2. Les deux protéines sont à l'état inactif dans le cytoplasme. Les GTPases Rac1 et Rac2 sont toutes deux capables d'activer la NADPH-oxydase *in vitro* (Abo et al., 1991; Sarfstein et al., 2004).

Les neutrophiles issus de souris déficiente *Rac2*^{-/-} présentent un déficit de production d'ions superoxydes. Ces souris sont aussi susceptibles aux infections à *Aspergillus fumigatus* (Roberts et al., 1999). Dans les macrophages, la forme majoritaire des Rac est Rac1. Pourtant des macrophages mutants pour *Rac2*^{-/-} ont un déficit de production d'O₂^{•-} en réponse à l'ester de phorbol (PMA) et présente aussi des défauts de phagocytose dépendante des immunoglobulines. Ces cellules sont aussi moins nombreuses au site d'inflammation. Néanmoins, une stimulation par d'autres molécules (particules de zymosans opsonisées) n'inhibe ni la phagocytose, ni la production des dérivés d'oxygène (Yamauchi et al., 2004). Ceci suggère que Rac1 et Rac2 sont contrôlées par différentes voies de signalisation dans ces cellules. En général chez la souris, Rac1, bien que présente dans la cellule, ne semble pas être impliquée dans l'activation de la NADPH-oxydase en réponse aux différents activateurs testés (Glogauer et al., 2003; Gu et al., 2003).

Chez l'homme, c'est Rac1 qui semble être l'activateur principal de la NADPH-oxydase dans les monocytes. Cette GTPase est relocalisée à la membrane et interagit avec p67phox et p47phox en réponse à deux activateurs zymosan et ester de phorbol (PMA) (Zhao et al., 2003).

➤ **Rôle des autres Rho GTPases dans la régulation de la NADPH-oxydase.**

Cdc42 a un rôle modulateur sur la NADPH oxydase en retardant ou modulant son activation de la NADPH-oxydase par compétition avec Rac pour la fixation du cytochrome b558 du la NADPH-oxydase. En système acellulaire Cdc42 inhibe l'activation de la NADPH-oxydase par Rac. Dans des neutrophiles humain, l'inhibition de Cdc42, par introduction du domaine CRIB de WASP fixant spécifiquement Cdc42, augmente de deux à trois fois la production d'ions superoxydes en réponse au fMLP (Diebold et al., 2004).

Récemment, il a été montré que Rho avait un rôle dans l'activation de la NADPH-oxydase, lors de la phagocytose de particules de zymosans opsonisées, en permettant la phosphorylation de p47phox (Kim et al., 2003a).

➤ **Signalisation par les espèces réactives de l'oxygène**

Les espèces réactives de l'oxygène dont celles produites par la NADPH-oxydase ont un rôle dans le contrôle de certaines voies de signalisation, par exemple dans l'activation des voies PI3K/Akt, les voies MAPK (p38 et ERK1/2) et des facteurs NF- κ B ou encore les voies de contrôle de l'apoptose (Adler et al., 1999; Asehnoune et al., 2004).

Plusieurs données de la littérature montrent un rôle des espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène dans la régulation des voies NF- κ B notamment au niveau des leucocytes. Dans les neutrophiles murins, l'activation NF- κ B dépendante du TLR4 en réponse aux LPS est bloquée par des antioxydants. Ces derniers, en bloquant l'activation de l'I- κ B-kinase (IKK), empêchent la translocation nucléaire du facteur NF- κ B. Les ROS agissent dans ce processus au niveau des kinases associées aux TLRs, IRAK1 et IRAK4 (**I**nterleukin-1 **R**eceptor **A**ssociated **K**inase) (Asehnoune et al., 2004; Ryan et al., 2004).

Dans les cellules dendritiques, en réponse au LPS, les espèces réactives de l'oxygène sont nécessaires à l'activation de Traf6/ASK1 (**A**poptosis **S**ignal **r**egulating **K**inase)/p38 en aval du TLR4 (Matsuzawa et al., 2005). Dans les cellules épithéliales HEK293, l'activation de NOX4 qui interagit directement avec TLR4 et la production d'ions superoxydes permet l'activation de la voie du TLR (Park et al., 2004a).

➤ **Base moléculaire des effets distincts de Rac1 et Rac2**

Bien qu'ayant une identité de 92 %, Rac1 et Rac2 ont des rôles bien distincts. Les deux GTPases possèdent les mêmes domaines effecteurs (Fig. In.13). Les différences majeures entre les deux protéines se situent au niveau de la queue C-terminale entre les résidus 183 et 188 : Rac1 possède une queue polybasique KRKRK qui permet une oligomérisation alors que Rac2 possède seulement trois acides aminés basiques au milieu d'acides aminés neutres (RQKRA). Cette séquence est impliquée dans la localisation intracellulaire des GTPases (Michaelson et al., 2001) et module les interactions avec les effecteurs en aval par exemple de PAK1 (Knaus et al., 1998). Dans les neutrophiles en absence de stimulation, Rac2 a une localisation cytoplasmique et périnucléaire, la stimulation par le chimioattractant fMLP induit une redistribution de la protéine à la périphérie de la cellule mais de manière distincte de

l'actine polymérisée. Rac1 est au départ dispersée dans le cytoplasme cellule : la stimulation des cellules induit une localisation à la périphérie de la cellule et une colocalisation avec la F-actine. Dans des neutrophiles murins *Rac2*^{-/-}, l'expression d'une forme de Rac2 ayant la queue polybasique de Rac1 ne compense pas les défauts de migration et de réponse au chimiotactisme des cellules au contraire d'une forme de Rac1 avec la queue de Rac2. Cette queue polybasique est aussi impliquée dans la spécificité de Rac2 pour l'activation de la NADPH-oxydase (Yamauchi et al., 2004; Yamauchi et al., 2005). Les acides aminés 148-151 et plus particulièrement l'acide aspartique en position 150 de Rac2 qui diffère entre les deux protéines, sont, au même titre que la queue polybasique de Rac2, nécessaires à la localisation subcellulaire, au chimiotactisme et à la polymérisation de l'actine au niveau périphérique. Il existerait aussi une interdépendance de Rac1 et Rac2, la localisation cellulaire de Rac1 est nécessaire à l'activité de Rac2 (Yamauchi et al., 2004). Ces différences pourraient aussi être liées à l'activation par des GEFs différentes.

```

human_Rac1      MQAIKCVVVG DGAVGKTC LLISYTTNAFFGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPVNLGLWDTAG 60
mouse_Rac1      MQAIKCVVVG DGAVGKTC LLISYTTNAFFGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPVNLGLWDTAG 60
human_Rac2      MQAIKCVVVG DGAVGKTC LLISYTTNAFFGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPVNLGLWDTAG 60
mouse_Rac2      MQAIKCVVVG DGAVGKTC LLISYTTNAFFGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPVNLGLWDTAG 60
Drosophila_Rac1 MQAIKCVVVG DGAVGKTC LLISYTTNAFFGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPVNLGLWDTAG 60
drosophila_Rac2 MQAIKCVVVG DGAVGKTC LLISYTTNAFFGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPVNLGLWDTAG 60

human_Rac1      QEDYDRLRPLSYPTQDVFLICFSLVSPASFENVRKAWFPEVRHHCPNTPPIILVGTIKLIDLR 120
mouse_Rac1      QEDYDRLRPLSYPTQDVFLICFSLVSPASFENVRKAWFPEVRHHCPNTPPIILVGTIKLIDLR 120
human_Rac2      QEDYDRLRPLSYPTQDVFLICFSLVSPASFENVRKAWFPEVRHHCPNTPPIILVGTIKLIDLR 120
mouse_Rac2      QEDYDRLRPLSYPTQDVFLICFSLVSPASFENVRKAWFPEVRHHCPNTPPIILVGTIKLIDLR 120
Drosophila_Rac1 QEDYDRLRPLSYPTQDVFLICFSLVSPASFENVRKAWFPEVRHHCPNTPPIILVGTIKLIDLR 120
drosophila_Rac2 QEDYDRLRPLSYPTQDVFLICFSLVSPASFENVRKAWFPEVRHHCPNTPPIILVGTIKLIDLR 120

human_Rac1      DDKDTIEKLEKKLIPITYPQGLAMAEIGAVKYLECSALTQRLGKTVFDEAIRAVLCPP 180
mouse_Rac1      DDKDTIEKLEKKLIPITYPQGLAMAEIGAVKYLECSALTQRLGKTVFDEAIRAVLCPP 180
human_Rac2      DDKDTIEKLEKKLIPITYPQGLAMAEIGAVKYLECSALTQRLGKTVFDEAIRAVLCPP 180
mouse_Rac2      DDKDTIEKLEKKLIPITYPQGLAMAEIGAVKYLECSALTQRLGKTVFDEAIRAVLCPP 180
Drosophila_Rac1 DDKDTIEKLEKKLIPITYPQGLAMAEIGAVKYLECSALTQRLGKTVFDEAIRAVLCPP 180
drosophila_Rac2 DDKDTIEKLEKKLIPITYPQGLAMAEIGAVKYLECSALTQRLGKTVFDEAIRAVLCPP 180

human_Rac1      EVKKRKRKCLILL 193
mouse_Rac1      EVKKRKRKCLILL 193
human_Rac2      PTRQQKRKCSLL 192
mouse_Rac2      PTRQQKRKCSLL 192
Drosophila_Rac1 LQPKSKRKCLILL 192
drosophila_Rac2 VRGPKRKHCLILL 192

```

Figure In. 13 : Alignement des séquences protéiques des GTPases Rac1 et Rac2 de l'homme, de la souris et de la drosophile. La séquence est très conservée entre les différents organismes.

Carrés noirs : acides aminés différents chez la drosophile par rapport aux Rac de mammifères.

Carré rouge : acides aminés responsables de la spécificité de Rac2 pour le contrôle de la réponse chimotactique et la relocalisation de la GTPase.

Carré bleu : localisation périnucléaire et relocalisation subcellulaire lors de la réponse chimotactique de Rac2. Ce domaine est nécessaire pour le contrôle la migration cellulaire des neutrophiles murins et la spécificité d'activation de la NADPH-oxydase par Rac2 (Filippi et al., 2004).

4. Les Rho GTPases : cibles de toxines bactériennes

De nombreuses toxines bactériennes affectent, comme ExoS, l'activité des Rho GTPases soit pour les activer soit pour les inhiber en fonction du type bactérien et de son mode d'infection (Tab. In.2). Les toxines agissent de deux manières sur les GTPases soit par

des modifications directes et irréversibles des GTPases, soit en mimant les effets des protéines régulatrices endogènes comme les GAPs ou GEFs (Aktories et al., 2000; Barbieri et al., 2002; Aktories et Barbieri, 2005).

a. Toxines inhibant les Rho GTPases

La glucosylation, par certaines toxines de *Clostridium spp*, des Rho GTPases empêche l'interaction avec leurs effecteurs ou avec les molécules régulatrices GAPs et GEFs et inhibe le cycle membrane-cytosol : les Rho GTPases restent à la membrane. Ceci provoque une modification du cytosquelette, pouvant conduire au détachement des cellules et à l'activation d'une réponse inflammatoire. Ces toxines sont aussi à l'origine des défauts de sécrétion, d'apoptose, d'inhibition de la réponse au chimioattractants et de la phagocytose. La structure de barrière endothéliale est aussi modifiée par ces toxines.

Il existe un certain nombre de toxines ayant comme ExoS une activité GAP et ayant des effets similaires dans la cellule. Par exemple la toxine YopE de *Yersinia* est strictement similaire au domaine GAP d'ExoS.

b. Toxines activant les Rho GTPases

Les toxines activant les Rho GTPases perturbent, elles aussi, la réponse immunitaire et peuvent affecter la phagocytose et les structures jonctions serrées entre les cellules. Elles vont aussi modifier complètement l'architecture de la cellule. Par exemple, CNF (Cytotoxic Necrotising Factor) empêche l'hydrolyse du GTP sous l'action des GAPs, ce qui induit une activation transitoire de la voie des JNK, puisque Rac est dégradée rapidement par le protéasome. De plus cette toxine augmente la toxicité des cellules Natural killer et des lymphocytes T par rapport aux cellules épithéliales, augmentant la perméabilité de la barrière céphalique (Hoffmann et Schmidt, 2004). Elle induit aussi l'explosion oxydative et inhibe la phagocytose par les neutrophiles humains (Hofman et al., 2000).

Toutes ces toxines ont pour effet de modifier la réponse immunitaire de l'hôte afin de faciliter la multiplication de la bactérie dans l'organisme. Les pathogènes extracellulaires induisent en général la mort par apoptose des cellules et ont des effets antiphagocytiques. (Fiorentini et al., 2003).

Au contraire, *Salmonella* pénètre les cellules épithéliales en stimulant la phagocytose, à travers l'action des toxines SopE, SipC qui vont induire la polymérisation du cytosquelette d'actine. La présence de la toxine SipA empêche la dépolymérisation de l'actine dépendante de l'ADF/cofiline. Après l'invasion de la cellule, la toxine SptP inactive les Rho GTPases et modifie la morphologie de la cellule infectée pour échapper aux mécanismes de défense de l'organisme (Barbieri et al., 2002; Aktories et Barbieri, 2005).

Toxine	activité	Rho GTPases cibles
Toxine glucosylante de <i>Clostridium</i>		
Toxine A et B (<i>C. difficile</i>)	Glucosylation des Rho GTPases	Rho, Rac, Cdc42 : inactivation
Toxine hémorragique (<i>C. sordelli</i>)	Glucosylation des Rho/Ras GTPases	Rac, (Cdc42), Ras, Ral, Rap mais pas RhoA : inactivation
Toxine B 1470 (<i>C. difficile</i>)		
Toxine létale (<i>C. sordelli</i>)	Rho GTPases des Rho/Ras GTPases	Rac, (Cdc42), Ras, Ral, Rap mais pas RhoA : inactivation
Toxine α (<i>C. novyi</i>)	N-acétyl-glucose-aminylation des Rho GTPases	Rho, Rac, Cdc42 : inactivation
Toxine à activité ADP-ribosyl transférase		
Exoenzyme C3 : C3boy (<i>C. botulinum</i>), C3lim (<i>C. limosum</i>), C2cer (<i>Bacillus cereus</i>), C3stau (<i>S. aureus</i>)	ADP-ribosylation des Rho GTPases	RhoA, RhoB, RhoC : inactivation
		C3stau RhoE/Rnd3 : inactivation
Protéase ciblant les Rho GTPases		
YopT (<i>Yersinia enterocolitica</i>) (type III)	Clivage de la Cystéine C-terminal isoprénylée	Rho, (Rac, Cdc42) : inactivation
Toxines trans glutaminantes/ dé-amidantes Rho GTPases		
CNF1, CNF2 (<i>E. coli</i>)	dé-amidation	Rho, Rac, Cdc42, RhoA dans les cellules intactes : activation
CNFY (<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>)	trans-glutamination	Rho, Rac, Cdc42 : activation
DNT (<i>Bordetella spp</i>)		
Toxines affectant les l'activation des Rho GTPases		
SopE, SopE2 (<i>Salmonella</i>)	GEFs	Rho, Rac, Cdc42 : activation
ExoS, ExoT (<i>P. aeruginosa</i>)	GAPs pour les Rho GTPases,	Rho, Rac, Cdc42 : inhibition
YopE (<i>Yersinia spp</i>) (type III)	(ADP-Ribosyl tansférase pour ExoS et ExoT)	Voir précédemment
SptP (<i>Salmonella</i>) (type III)	GAPs et activité Tvrosine phosphatase	Rho, Rac, Cdc42 : inhibition

Tableau In. 2 : Toxines bactériennes ciblant les Rho GTPases d'après Aktories (2005)

5. Implication des Rho GTPases dans la réponse au stress de la drosophile

Il existe chez la drosophile, trois protéines de type Rac (Rac1, Rac2 et Mtl), une protéine Rho de type RhoA ainsi qu'une protéine atypique RhoL, une protéine Cdc42 et une protéine RhoBTB. RhoL ne possède pas d'homologue chez les mammifères (Fig. In.5).

Au niveau structural, les séquences de DRac1 et DRac2 sont très proches des Rac de mammifères. Les mêmes régions diffèrent entre les quatre protéines : à savoir la queue C-terminale (acides aminés 183-188) et la région comprise entre les acides aminés 148 à 151.

Ces deux séquences chez la drosophile ne sont pas strictement équivalentes à celle des Rac de mammifères (Fig In.13). Chez la drosophile, la queue C-terminale possède quatre acides aminés basiques dont seule la position change. Mtl est une protéine beaucoup plus grosse et divergente avec une queue N-terminale non présente dans les deux autres protéines.

Chez drosophile, la fonction des Rho GTPases a été étudiée au cours du développement. Les trois GTPases semblent avoir des rôles redondants au cours de l'embryogenèse, il faut une mutation des trois gènes pour avoir une létalité embryonnaire (Hakeda-Suzuki et al., 2002). Comme chez les mammifères, elles régulent de nombreuses voies de signalisation permettant le réarrangement du cytosquelette d'actine et l'activation de voies de signalisation comme la voie des JNK (Noselli et Agnes, 1999; Woolner et al., 2005). Peu de données dans la littérature montrent un rôle de ces GTPases dans la réponse immunitaire chez la drosophile.

Chez la drosophile adulte, des expériences sur puces à ADN ont montré que Rac2 et RhoL sont exprimées après infection, l'expression de Rac2 est aussi induite par le stress oxydant (Boutros et al., 2002; Girardot et al., 2004). Un crible par ARN interférence (RNAi) en cellules S2, visant à identifier, des éléments régulateurs de la voie de la réponse immunitaire Imd/NF- κ B, a mis en évidence une induction deux fois plus forte du gène rapporteur dipt-lacZ (diptéricine-lacZ), en cas d'inactivation de l'expression de Rac2, après stimulation par le LPS. Rac2 semble donc avoir un rôle de régulateur négatif de la synthèse des peptides antimicrobiens (Foley et O'Farrell, 2004).

Chez l'embryon, le phénomène de fermeture dorsale souvent considéré comme s'apparentant au phénomène de cicatrisation, correspond à l'élongation des cellules épidermiques situées de chaque côté de l'embryon pour recouvrir l'amnioséreuse. Ce processus nécessite un réarrangement du cytosquelette d'actine, la présence de molécules d'adhésion, ainsi que l'activation de la voie des JNK et des Rho GTPases. Différentes études ont montré que Rac permet l'activation de la voie des JNK et participe aussi à la fusion de l'épithélium dorsal (Noselli et Agnes, 1999; Woolner et al., 2005).

L'embryon de drosophile sert aussi de modèle pour l'étude des phénomènes de cicatrisation et de migration cellulaire. Dans les embryons blessés par laser, des expériences en utilisant des formes dominantes négatives ou des mutations perte de fonction des différentes Rho GTPases ont permis de comprendre la fonction de ces GTPases au cours de la cicatrisation. Rho participe à la formation des câbles d'actine autour de la cicatrice. Cdc42 est nécessaire à la formation des protusions membranaires (Noselli, 2002). La blessure induit

aussi un recrutement rapide des hémocytes embryonnaires qui dépend des Rho GTPases pour assurer pour la phagocytose des débris cellulaires (Stramer et al., 2005).

Chez l'adulte et la larve la cicatrisation fait aussi intervenir les JNK (Ramet et al., 2002a; Galko et Krasnow, 2004).

III. la réponse immunitaire chez la drosophile

La réponse immunitaire des insectes présente une conservation fonctionnelle et moléculaire avec la réponse immunitaire innée des mammifères (Silverman et Maniatis, 2001). Chez la drosophile, la barrière épithéliale et la cuticule correspondent aux premières barrières rencontrées par les pathogènes. Les épithélia comme ceux de l'intestin, le tractus génital, la trachée et les tubules de Malpighi sont aussi capables de sécréter des peptides antimicrobiens permettant l'élimination des pathogènes (Ferrandon et al., 1998; Tzou et al., 2000).

Si les pathogènes entrent dans l'hémocèle soit par piqûre septique soit à travers les barrières épithéliales, ils se retrouvent confrontés à la fois à la réponse humorale systémique et à la réponse cellulaire. La réponse humorale est une réponse antimicrobienne qui permet l'activation de nombreux gènes de la réponse immunitaire dont les peptides antimicrobiens sécrétés dans l'hémolymphe (De Gregorio et al., 2001; Irving et al., 2001; De Gregorio et al., 2002b; Boutros et al., 2002). Ces peptides sont produits principalement par le corps gras, un organe ayant des fonctions similaires au foie des mammifères, ainsi que par les plasmatocytes (Hoffmann et Reichhart, 2002) (Tab. In.3). La production des peptides antimicrobiens au cours de la réponse humorale dépend de deux voies de signalisation activées de manière différentielle en fonction des pathogènes : ce sont la voie Toll et la voie Imd (**Immune deficiency**) (Hoffmann et Reichhart, 2002).

La mélanisation et la coagulation sont d'autres mécanismes de défense chez la drosophile, la mélanisation participe entre autre à la cicatrisation et à l'encapsulation des pathogènes qui ne peuvent pas être phagocytés comme certains parasites. La réponse cellulaire repose sur les cellules de la lignée hématopoïétique, il en existe trois classes : les cellules à cristaux, les lamellocytes et les plasmatocytes.

Tableau In. 3 : Expression et spécificité des peptides antimicrobiens, d'après Hoffmann (2002)

Peptides antimicrobiens	Nombre de paralogues dans le génome	Spécificités principales	Concentrations dans l'hémolymphe après infection (µM)	Pathogènes activateur de leur sécrétion
Drosomycine	7	Champignons	100	Champignons, Gram positif, (Gram négatif : transitoire)
Metchkowine		Champignons, (Gram positif)	40	Gram positif, Gram négatif
Défensine	2	Gram positif	1	Gram négatif, Gram positif
Cécropine	4	Gram négatif, (Champignons, Gram positif)	20	Gram négatif
Drosocine		Gram négatif	40	Gram négatif
Attacine	4	Gram négatif		Gram négatif
Diptéricine	2	Gram négatif	0,5	Gram négatif

Dans cette partie, j'exposerai essentiellement les mécanismes de régulation de la réponse immunitaire en réponse aux infections bactériennes. La majorité des données existantes sur les mécanismes de la réponse immunitaire a été obtenue en infectant les mouches par piqûre septique. Néanmoins, les souches bactériennes utilisées ne sont pas toujours des pathogènes naturels de la drosophile. La blessure due à la piqûre elle-même est probablement responsable d'une partie de la réponse observée. La majorité des bactéries n'active pas la réponse systémique lors des infections par ingestion de nourriture contaminée. A l'exception de certains pathogènes, parmi lesquels les bactéries *Erwinia carotava* spp qui sont capables d'induire la réponse systémique de leur hôte lors d'infection par ingestion (Basset, et al., 2000).

1. Les récepteurs de la réponse immunitaire

Une étape importante de la réponse immunitaire est la reconnaissance des pathogènes par des récepteurs (PRR : **P**attern **R**ecognition **R**eceptor) capables de reconnaître des motifs présents à la surface des microorganismes (PAMPs : **P**athogen **A**ssociated **M**olecule **P**atterns) (Janeway, 1989). Ces PAMPs peuvent être, par exemple, les LPS des bactéries à Gram négatif, les peptidoglycanes bactériens ou encore le β 1,3 glucane etc... Cette reconnaissance permet d'avoir une réponse immunitaire adaptée au type d'agent infectieux. Deux classes principales de PRRs ont été identifiées chez la drosophile : ce sont les récepteurs de la famille des récepteurs du peptidoglycane (PGRP : **P**epidoglycan **R**ecognition **P**rotein) et les récepteurs de type GGBP (**G**ram-**N**egative **B**inding **P**roteins). La reconnaissance des

pathogènes par les différents PRRs permet d'avoir une réponse antimicrobienne adaptée (Tab In.3) (Royet, 2004).

a. Les PGRPs (Peptidoglycan Recognition Protein)

Les PGRPs sont des récepteurs retrouvés aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés, ils possèdent une séquence commune de 160 acides-aminés présentant une similarité avec le lysosyme T7 (Royet, 2004). Chez la drosophile, 13 gènes codent des protéines de la famille des PGRPs qui peuvent avoir différentes isoformes (Werner, et al., 2000). Les PGRPs sont classées en deux sous-familles : les formes courtes (PGRP-S) comprennent 7 gènes codant pour des formes sécrétées et les formes longues (200 à 600 acides aminés) correspondent en général à des protéines membranaires (PGRP-LC, LD, LA) mais aussi intracytoplasmiques (PGRP-LB).

- Le premier PGRP découvert a été PGRP-SA (Semelweiss), un récepteur à activité carboxy-peptidase, dont la mutation affecte la résistance des drosophiles aux bactéries à Gram positif dont *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* et *Enterococcus faecalis* et ne permet pas l'induction de l'expression de la drosomycine en réponse à ces infections (Michel et al., 2001; Chang et al., 2004). Par contre d'autres bactéries à Gram positif comme *Streptococcus pyogenes* induisent normalement l'expression de la drosomycine chez le mutant *PGRP-SA* (Bischoff et al., 2004). *In vitro*, son affinité varie en fonction de l'origine du peptidoglycane, il peut ainsi reconnaître avec plus moins d'affinité le peptidoglycane de certaines bactéries à Gram négatif dont *E. coli* (Mellroth et al., 2005). L'activation de la voie Toll par PGRP-SA dépend d'une coopération et de la formation d'un complexe avec le récepteur GNBP-1/osiris (Gobert et al., 2003; Pili-Floury et al., 2004). En effet, la double mutation *PGRP-SA/GNBPI* ne rend pas les mouches plus sensibles aux infections que la simple mutation d'un des deux gènes (Fig. In.14).

- PGRP-SD a un rôle dans la réponse à certaines bactéries à Gram positif : le mutant est sensible aux infections par *S. aureus* ou par *S. pyogenes*. La mutation de PGRP-SD en combinaison avec la mutation de *PGRP-SA* ou de *GNBPI* augmente les effets des mutations *PGRP-SA* ou de *GNBPI* sur l'activation de la drosomycine, alors que la mutation *PGRP-SD* seule n'affecte pas la transcription de la drosomycine montrant ainsi l'existence d'une certaine redondance fonctionnelle entre les récepteurs (Bischoff et al., 2004) (Fig. In.14).

- PGRP-LB reconnaît *in vitro* le peptidoglycane de *E. coli* et de *S. aureus* et il possède une activité amidase (Kim et al., 2003b).
- La protéine PGRP-LC permet la reconnaissance des bactéries à Gram négatif pour l'activation de la voie Imd et pour la phagocytose par les hémocytes (Gottar et al., 2002; Ramet et al., 2002b). *In vitro*, PGRP-LC lie avec une forte affinité tous les peptidoglycanes, son activité dépend de la formation d'un complexe entre ces différentes isoformes (Chang et al., 2005; Mellroth et al., 2005) (Fig. In.15). Son rôle dans l'activation de la voie Imd dépend en partie d'une coopération avec le récepteur sécrété PGRP-LE (Takehana et al., 2004).
- La surexpression de PGRP-LE active la voie Imd et la cascade de la prophénol-oxydase induisant la mélanisation. Cette protéine extracellulaire est exprimée par les hémocytes et le corps gras (Takehana et al., 2002; Takehana et al., 2004) (Fig. In.14).

b. Les récepteurs GNBPs (Gram-Negative Binding Protein)

Les récepteurs GNBPs ont été isolés dans de nombreuses espèces d'insectes mais ne sont pas retrouvés chez les vertébrés. Ils possèdent un peptide signal suggérant qu'ils sont sécrétés dans le milieu extracellulaire. Le génome de la drosophile en possède au moins trois.

La protéine GGBP1 *in vitro* lie le LPS et le β 1,3 glucane (Kim et al., 2000). La mutation *GNBP1* ou l'expression d'un dsRNA (double strand RNA) contre *GNBP1* rend les drosophiles plus sensibles aux infections par des bactéries à Gram positif. L'expression de la drosomycine n'est pas activée chez ce mutant. La coexpression de PGRP-SA et GGBP1 induit l'activation de la voie Toll, suggérant une codépendance entre ces deux récepteurs (Gobert et al., 2003; Pili-Floury et al., 2004).

2. Réponse humorale par le corps gras

Lors d'une infection par piqûre septique, la réponse systémique dépend de la reconnaissance des pathogènes, de la production de peptides antimicrobiens par le corps gras et de leur sécrétion dans l'hémolymph (Tab. In.3).

La réponse systémique dépendante du corps gras repose sur l'activation de deux voies de signalisation qui sont les voies Toll et Imd (Fig. In. 14 et In.15) (Hoffmann et Reichhart, 2002). Leur activation permet la translocation nucléaire des facteurs de transcription de la famille Rel/NF- κ B ce qui induit l'expression des peptides antimicrobiens et de nombreux

autres gènes (De Gregorio et al., 2002b). La voie Toll est une voie très similaire aux voies TLRs des mammifères, tandis que la voie Imd possède des homologies avec les voies du TNF des mammifères (Silverman et Maniatis, 2001).

➤ La voie Toll

Cette voie a été tout d'abord identifiée pour son rôle dans l'établissement de l'axe dorso-ventral chez l'embryon et ensuite caractérisée pour son implication dans la réponse immunitaire (Lemaitre et al., 1996). La résistance aux champignons ou aux bactéries à Gram positif dépend de la voie Toll : des mutants de la voie Toll sont sensibles à ces deux types de pathogènes (Rutschmann et al., 2002). Récemment, il a été mis en évidence un rôle important de cette voie dans la résistance aux virus (Zambon et al., 2005).

Toll est une protéine membranaire contenant des domaines répétés riches en leucine (LRR : **L**eucine-**R**ich **R**epeat) et un domaine intracellulaire TIR (**T**oll/**I**L-**R**eceptor 1). L'activation de Toll ne dépend pas comme chez les mammifères d'une interaction directe de Toll avec les pathogènes, mais de la reconnaissance des agents infectieux par des récepteurs circulants qui vont activer une cascade de Sérines Protéases conduisant à l'activation de la protéine de type cytokine Spaetzle (Fig. In.14). Spaetzle se fixe alors au récepteur Toll et permet son activation. Un certain nombre de données obtenues *in vitro* et *in vivo* suggèrent que la multimérisation des protéines Spaetzle et des récepteurs Toll a un rôle dans l'activation de la signalisation en aval du récepteur (Weber et al., 2003; Hu et al., 2004). L'activation de Toll permet le recrutement d'un complexe hétérotrimérique composé des deux protéines adaptatrices MyD88 et Tube et de la sérine thréonine kinase Pelle (homologue de la protéine humaine IRAK) (Horng et Medzhitov, 2001; Sun et al., 2002). Par des intermédiaires encore inconnus, la voie Toll aboutit à la phosphorylation et à la dégradation par le protéasome de l'inhibiteur Cactus/I- κ B (**I**nhibitor of **NF- κ B**), libérant ainsi le facteur de transcription NF- κ B DIF (**D**orsal-related **I**mmune **F**actor) (Manfrulli et al., 1999; Rutschmann et al., 2000a). La libération de DIF permet sa translocation nucléaire et l'activation de l'expression de peptides antimicrobiens dont la drosomycine ainsi que de nombreux autres gènes de la réponse immunitaire (Boutros et al., 2002; De Gregorio et al., 2002b). Au cours de la réponse immunitaire chez l'adulte, il a été montré que le facteur NF- κ B activé par la voie Toll est DIF. Des résultats suggèrent l'implication de Dorsal en redondance de DIF surtout chez la larve (Manfrulli et al., 1999; Lau et al., 2003).

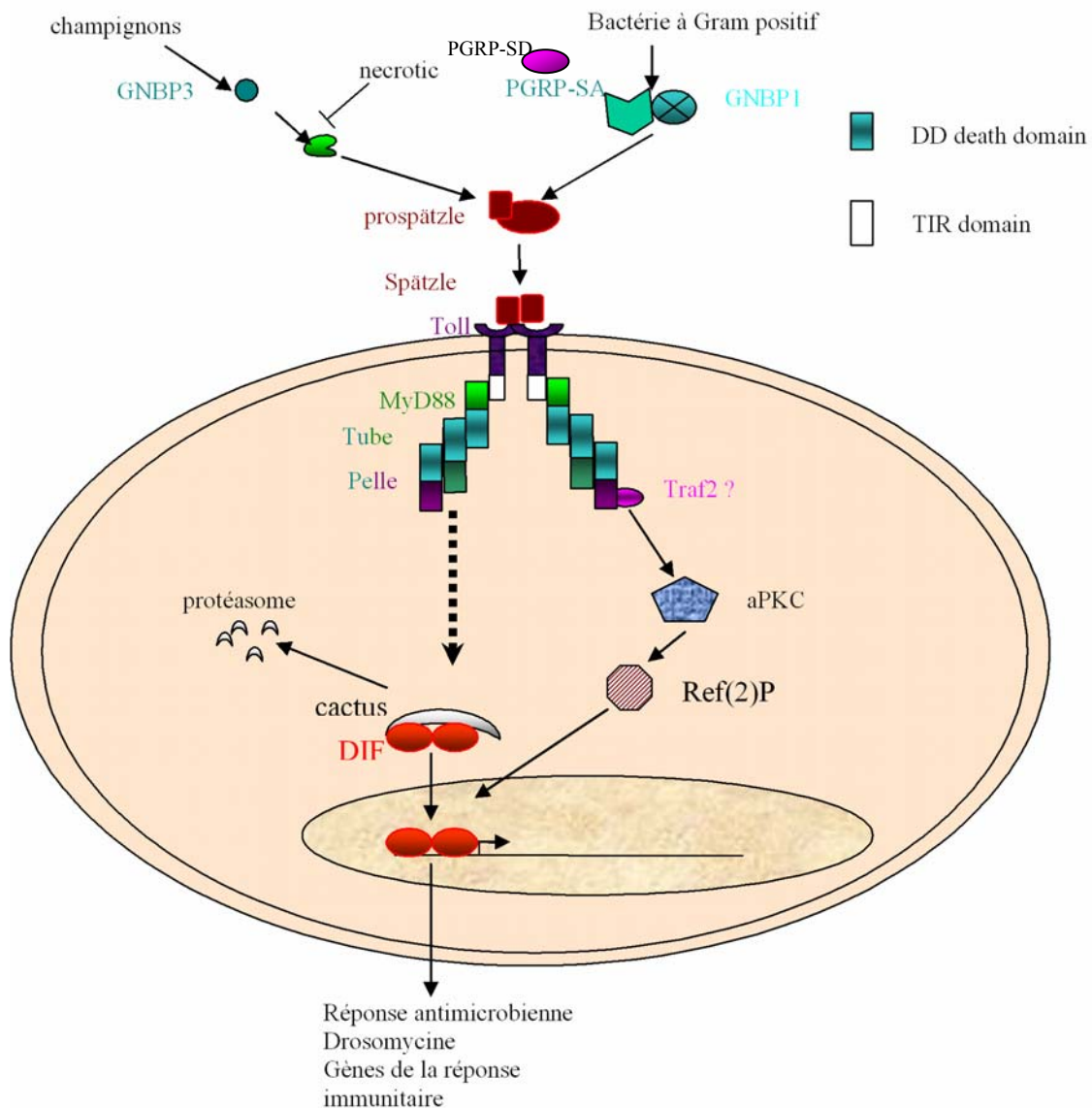


Figure In. 14 : Modèle d'activation de la voie Toll chez la drosophile

Lors d'une infection par des champignons la sérine protéase Perséphone est activée pour conduire à l'activation de Spaetzle, en temps normal elle est maintenue inactive grâce à l'inhibiteur de sérine protéase (Necrotic). La reconnaissance des bactéries à Gram positif ou des champignons conduit à l'activation de la voie Toll et à l'activation du facteur de transcription DIF. DIF une fois dans le noyau active l'expression de nombreux gènes cibles.

Traf2 (TNF Receptor-Associated Factor) interagit *in vitro* avec Pelle : la coexpression de ces deux protéines active l'expression de la drosomycine dans des cultures cellulaires (Shen et al., 2001). Dans la larve, la surexpression de Traf2 induit la transcription des peptides antimicrobiens dépendant de Dif et de Relish, alors que sa mutation empêche cette activation lors d'une infection. Réciproquement la mutation de *Traf2* empêche l'activation des peptides antimicrobiens en réponse aux infections (Cha et al., 2003). Pourtant, dans les

cellules S2, des expériences de RNAi contre les trois protéines Trafs de la drosophile n'ont pas d'effet sur l'expression de la drosomycine (Sun et al., 2002). Ainsi, l'implication de Traf2 dans le contrôle de la voie Toll est encore controversée.

L'activation de la voie Toll n'est pas uniquement linéaire, il existerait différents branchements en aval du récepteur. En cellules S2, la diminution de la DaPKC (**Protéine kinase C atypique**) par RNAi est suffisante pour diminuer la transcription de la drosomycine dépendante de la voie Toll. Dans les cellules, la DaPKC est nécessaire à l'activation de la voie Toll et fait partie de la voie Traf2/cRef(2)/DaPKC permettant l'activation de la drosomycine, indépendamment de la dégradation de Cactus et de la translocation nucléaire de DIF. Les auteurs de cette étude suggèrent un rôle de cette voie dans la potentialisation de l'activité du facteur de transcription DIF (Avila et al., 2002). Une autre donnée de la littérature montre une activation de la voie des JNK par la voie Toll chez la drosophile adulte (Boutros et al., 2002).

➤ **La voie Imd et la voie des JNK**

- **Activation et régulation de la voie Imd pour l'activation de Relish**

La découverte d'une mutation ne permettant pas l'expression des peptides antimicrobiens en réponse aux infections par des bactéries à Gram négatif a permis l'identification d'une voie de signalisation de la réponse immunitaire appelée Imd (Lemaitre et al., 1995) (Fig. In.15). IMD est une protéine à **Death-Domain (DD)** ayant des similarités avec la protéine RIP des mammifères (Georgel et al., 2001). Il existe de multiples embranchements en aval de IMD. Des cribles successifs ont mis en évidence un certain nombre de gènes, dont la mutation affecte l'expression des peptides antimicrobiens. Ceci a permis l'identification de certains éléments en aval de la voie Imd. L'activation de la voie Imd implique la MAPKKK, TAK1 (**TGF- β Activated Kinase 1**) (Vidal et al., 2001) qui permet l'activation du complexe IKK, dont les seuls éléments identifiés sont IKK β (Kenny) et IKK γ (ird5), qui permettraient la phosphorylation de Relish (Fig. In.15) (Silverman et al., 2000; Rutschmann et al., 2000b; Wu et al., 2001).

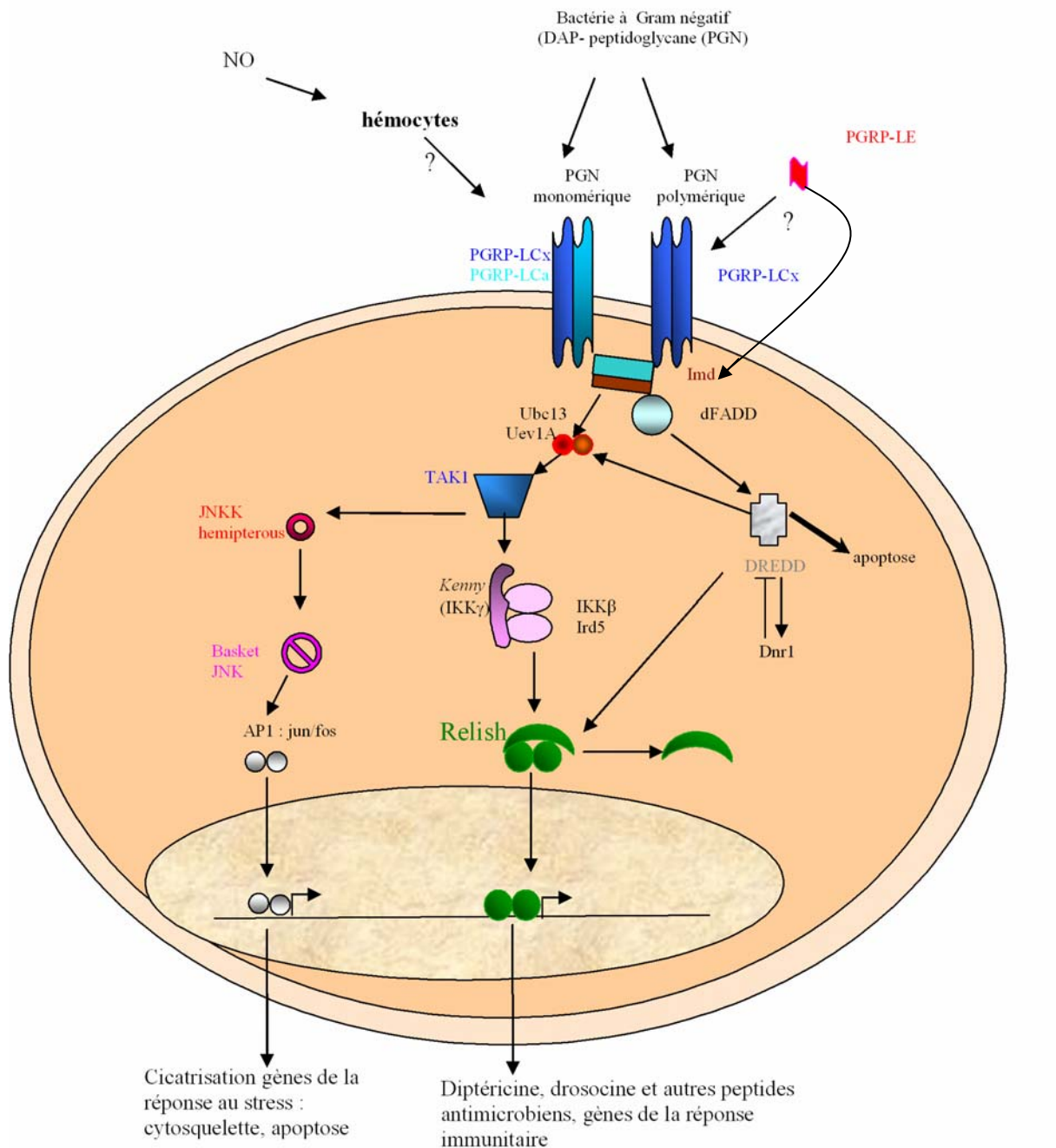


Figure In. 15 : Modèle de l'activation de la voie Imd chez *D. melanogaster*

La voie Imd est activée par les bactéries à Gram négatif. La voie TNF possède des similarités avec la voie Imd. Cette voie répond aux infections par des bactéries à Gram négatif et conduit à l'activation du facteurs Relish par l'intermédiaire de TAK1 et DREDD. Il existe un branchement de cette voie en direction de la voie des JNK.

En plus de cette voie linéaire, il existe un certain nombre d'embranchements en aval de IMD. Tout d'abord, il a été montré que la caspase-8 (Dredd) participe à l'activation des peptides antimicrobiens et à la résistance aux infections par des bactéries à Gram négatif (Elrod-Erickson et al., 2000; Leulier et al., 2000; Stoven et al., 2003). Des approches par RNAi et des études par épistasie ont permis l'identification de la protéine adaptatrice FADD

en aval de IMD qui permet le recrutement de Dredd (Leulier et al., 2002). L'activation de Relish par Dredd dépend également d'un clivage de la protéine Relish pour permettre la libération du domaine d'activation de la transcription (NF- κ B) Rel68 et du domaine d'auto-inactivation Rel49 (domaine à répétition ankyrine) (Stoven et al., 2003). Ce clivage dépendrait, soit directement de Dredd ou nécessiterait l'intervention d'une autre caspase non identifiée. Plus récemment, Dredd a été montrée comme ayant un rôle dans l'activation TAK1 (Zhou et al., 2005).

- **Rôle de l'ubiquitination dans la voie Imd**

Des régulateurs négatifs de la voie Imd ont été identifiés. SkpA et Dnr1 (**D**efense **R**epressor) sont deux protéines possédant des domaines E3 ubiquitine ligase qui régulent négativement la voie Imd et l'activation de Relish. SkpA est un composant du complexe SCF (SkpA/dcul1/Slimb) et pourrait directement induire la dégradation de Relish : son absence ou celui d'un des membres du complexe est suffisante pour induire une expression constitutive de la diptéricine (Khush et al., 2002).

Dnr1 possède des homologies avec les protéines inhibitrices des caspases: elle possède un domaine RING à activité E3 ubiquitine ligase. En cellules S2, cette protéine permet le maintien à l'état inactif de la voie Imd en absence d'infection, en inhibant la caspase Dredd. Dans les cellules S2, après stimulation de la voie Imd par le LPS, il existe une régulation en retour de Dnr1 par Dredd : Dredd permet la stabilisation de Dnr1 (Foley et O'Farrell, 2004).

Chez la drosophile, comme pour la régulation de l'activation de la voie du TNFR1 chez les mammifères, l'ubiquitination semble aussi jouer un rôle dans l'activation de la voie Imd. Dans les cellules S2, les enzymes de conjugaison à l'ubiquitine E2, Ubc13/bendless et UEV1A sont nécessaires à l'activation de TAK1 et de IKK en réponse au peptidoglycane (Kaneko et Silverman, 2005; Zhou et al., 2005)

- **Branchement de la voie Imd en direction de la voie des JNK**

La voie Imd active aussi la voie des JNK par l'intermédiaire de TAK1 qui pourrait directement phosphoryler la JNKK (Silverman et al., 2003) (Fig. In.15). La première évidence de l'implication de la voie des JNK dans la réponse immunitaire suggérait un rôle dans l'activation des peptides antimicrobiens (Sluss et al., 1996). En cellules S2, des doubles brins

d'ARN dirigés contre des éléments de la voie des JNK empêchent l'expression d'un certain nombre de gènes après stimulation par du LPS, dont des gènes codant pour des protéines régulatrices du cytosquelette d'actine, des gènes codant des éléments des voies apoptotiques (Boutros et al., 2002) etc... Chez l'adulte, après infection par des bactéries telles que *E. cloecae*, la voie des JNK est activée précocement dans la première heure post-infection, son activité diminue par la suite (Boutros et al., 2002; Park et al., 2004b). L'activation transitoire pourrait avoir un rôle dans la cicatrisation après les infections par piquêre septique.

Contrairement à ce qui avait été décrit précédemment, la voie des JNK ne paraît pas avoir un rôle direct sur l'expression des peptides antimicrobiens : deux études indépendantes montrent que la voie des JNK n'a pas d'effet sur l'activation des peptides antimicrobiens en réponse au LPS (Silverman et al., 2003; Park et al., 2004b). Pourtant, une autre étude en cellules S2 suggère que l'activation optimale de la synthèse des peptides antimicrobiens nécessite la voie des JNK (Kallio et al., 2005). En réalité, il semble exister une inter-régulation entre la voie des JNK et la voie Imd/Relish : la répression de la voie des JNK après son activation dépend de l'activité de Relish et de la dégradation par le protéasome de TAK1 (Park et al., 2004b). De la même manière, des données récentes montrent un rôle des JNK dans un contrôle négatif de l'activation de Relish (Kim et al., 2005).

Une autre voie conservée des MAPK apparaît impliquée dans la réponse immunitaire : la voie des p38 MAPK limite la synthèse des peptides antimicrobiens *in vivo* (Han et al., 1998). En cellules S2, cette voie est activée par le peptidoglycane et dépend de l'activation de la MEKK1 (Zhuang et al., 2005).

- **Régulation de la voie Imd par les hémocytes.**

Les hémocytes ont un rôle dans l'induction de la réponse immunitaire par le corps gras au cours des infections par ingestion. Bien que les infections par ingestion de bactéries comme *E. coli* ne rendent pas les larves *domino*, déficientes en hémocytes, plus sensibles à l'infection (Braun et al., 1998). La bactérie *Erwinia carotovora carotovora* active la réponse systémique au cours de ce type d'infection. Par contre l'absence d'hémocytes chez le mutant *domino* empêche l'activation de la diptéricine dans le corps gras (Basset et al., 2000; Foley et O'Farrell, 2003). Dans ce cas, l'activation de la voie Imd paraît être modulée par l'oxyde nitrique NO : l'injection de NO dans l'organisme est suffisante pour induire l'expression de la

drosomycine et de la diptéricine. Par contre, l'injection de NO dans le mutant *domino* n'active pas l'expression de la diptéricine (Foley et O'Farrell, 2003). Lors d'une infection naturelle par *E. carotovora*, l'activité de la NO synthase, présente au niveau de l'épithélium intestinal et dans les hémocytes, est nécessaire à l'expression de la diptéricine après infection. L'infection naturelle pourrait donc induire la production de NO qui agirait comme un signal secondaire en direction des hémocytes. Ces derniers enverraient un signal par l'intermédiaire d'une molécule de type cytokine encore non identifiée, en direction du corps gras pour activer la voie Imd.

Au cours des infections, la voie JAK (**J**ANUS **K**inase)/STAT est activée dans le corps gras et permet l'expression d'un certain nombre de gènes dont le gène *totA* (*turandot A*). Après infection, l'activation de la voie JAK/STAT, dans ce modèle, dépend de la sécrétion par les hémocytes d'une molécule de type cytokine Upd3. Upd3 est capable de se fixer au récepteur Domeless, présent à la surface des cellules du corps gras, et d'activer la voie JAK/STAT (Agaisse et Perrimon, 2004).

Finalement au cours des infections, les hémocytes expriment Spaetzle, le ligand de Toll, suggérant un lien supplémentaire entre la réponse cellulaire et la réponse humorale (Irving et al., 2005).

➤ Conclusion sur les voies Toll et Imd

Des données montrent qu'il serait réducteur de considérer un modèle sélectif d'activation de la voie Toll et Imd par des bactéries à Gram positif et à Gram négatif respectivement. Les bactéries à Gram négatif sont aussi capables d'activer une légère expression transitoire de la drosomycine. La voie Toll est nécessaire à la réponse aux infections par *P. aeruginosa*, une bactérie à Gram négatif (Lau et al., 2003). Elle aurait aussi un rôle dans la résistance à *E. coli* (De Gregorio et al., 2002b). La voie Imd est aussi impliquée dans la résistance à certaines bactéries à Gram positif comme *Micrococcus luteus*: une mutation d'un élément de la voie Toll ou Imd seule n'est pas suffisante pour rendre les mouches sensibles : elles le deviennent en cas de double mutation *spaetzle/Relish* (De Gregorio et al., 2002b; Leulier et al., 2002). D'autres résultats montrent que différentes espèces de champignons ou de bactéries à Gram positif induisent une expression sélective des différents peptides antimicrobiens dépendant de DIF et/ou Relish (Hedengren-Olcott, et al., 2004).

Certains PRRs comme PGRP-SA, sont capables de reconnaître des motifs microbiens appartenant aussi bien aux bactéries à Gram positif que Gram négatif avec plus ou moins d'affinité (Mellroth et al., 2005).

3. Cascade protéolytique : mélanisation, coagulation

La mélanisation est une réponse immédiate après infection (par reconnaissance de certaines molécules de surface β 1,3 glucane, LPS et peptidoglycane) et participe à la cicatrisation. Chez les arthropodes, elle requiert l'activation d'une cascade de sérine protéases déclenchant l'activation de la prophénol-oxydase qui devient une phénol-oxydase active permettant la synthèse de quinones. Les quinones sont directement toxiques pour les pathogènes et polymérisent pour participer à la formation des capsules de mélanine autour des parasites (Cerenius et Soderhall, 2004; Meister, 2004). Chez les arthropodes la production de la mélanine dépend d'enzymes activatrices, les PPAEs (**P**rophénol-**O**xydase **A**ctivating **E**nzyme). Les éléments responsables de la mélanisation sont présents dans l'hémolymphe de façon constitutive ainsi que dans les cellules à cristaux qui expriment deux prophénol-oxydases (Meister, 2004; Irving et al., 2005). L'activité de ces PPAEs est inhibée en temps normal par des inhibiteurs des sérines protéases (Cerenius et Soderhall, 2004). Les mécanismes de régulation de la mélanisation sont encore mal définis chez la drosophile. Le processus de mélanisation requiert la disparition locale d'une sérine protéase ; la serpine 27A (*Spn27A*), qui aurait un rôle dans le maintien de la forme inactive de phénol-oxydase dans l'hémolymphe. Un mutant *Spn27A* mélanise spontanément, ce phénomène augmentant encore en cas de piqûre septique (De Gregorio et al., 2001). La voie Toll a un rôle dans la mélanisation en permettant la disparition locale de *Spn27A* dépendante de la sécrétion d'un autre facteur encore non identifié (Ligoxygakis et al., 2002). Les infections induisent l'expression d'un certain nombre de gènes codant pour des éléments régulateurs de la mélanisation (De Gregorio et al., 2002a; Ligoxygakis et al., 2002). En plus de son rôle dans l'activation de la voie Imd, le récepteur PGRP-LE a aussi un rôle dans la mélanisation : la surexpression de PGRP-LE induit la mélanisation (Takehana et al., 2002; Takehana et al., 2004).

4. Réponse cellulaire

La réponse cellulaire repose sur les cellules de la lignée sanguine qui n'ont pas comme chez les vertébrés, une fonction de transport de l'oxygène. Chez la larve, la réponse cellulaire dépend de trois types d'hémocytes qui sont les plasmatocytes, les lamellocytes et les cellules à cristaux (Meister et Lagueux, 2003; Meister, 2004) (Fig. In.16). Les lamellocytes ne se différencient qu'en cas d'infection par des parasites (Lanot et al., 2001). Chez l'adulte, seuls les plasmatocytes issus de la vie larvaire et embryonnaire persistent (Lanot et al., 2001; Holz et al., 2003). Les plasmatocytes et les cellules à cristaux sont aussi présents chez l'embryon.

Les cellules à cristaux et les lamellocytes n'ont pas d'équivalent chez les mammifères, tandis que les plasmatocytes ont des propriétés similaires à celles des macrophages des mammifères : ces deux types de cellules sont capables de phagocyter des pathogènes et de sécréter des molécules participant à l'activation de la réponse immunitaire. Il existe une autre catégorie de cellules : les cellules sécrétrices, dérivant probablement des plasmatocytes, qui sont présentes uniquement au niveau de la glande de la lymphe. Ces cellules sont capables de sécréter par exemple des composants de la matrice extracellulaire dont la peroxidasine (Nelson et al., 1994; Lanot et al., 2001).

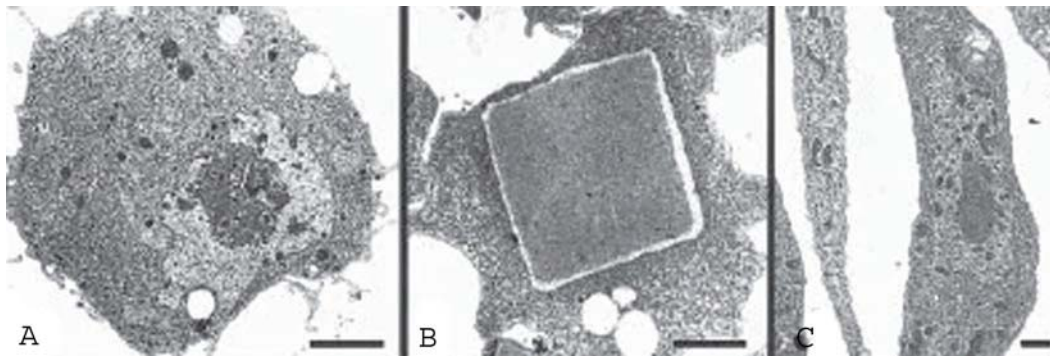


Figure In. 16 : Morphologie des hémocytes de la drosophile. Photographie à microscopie électronique à transmission (D'après Meister, 2003)

A : plasmatocyte, B : cellule à cristaux, C : lamellocytes. (barre = 2µm)

a. Plasmatocytes : phagocytose

Les plasmatocytes (Fig. In.16A) sont l'équivalent de la lignée des monocytes-macrophages des mammifères. Ces cellules ont un rôle important au cours du développement pour phagocyter les cellules apoptotiques et permettre le remodelage de l'organisme au cours

de l'embryogenèse et de la métamorphose (Tepass et al., 1994; Franc et al., 1999; Lanot, et al., 2001).

Ces cellules sont aussi capables de phagocyter des pathogènes par des mécanismes similaires aux macrophages des mammifères (Ramet et al., 2001; Pearson et al., 2003). Les changements morphologiques des cellules dépendent de la polymérisation et de la régulation des filaments d'actine. Un crible de lignées mutantes de drosophiles, cherchant à identifier les éléments de contrôle de la phagocytose, a permis de mettre en évidence un certain nombre de gènes dont la mutation affecte la capacité des plasmatocytes, isolés à partir de larves au stade L3, à phagocyter des particules bactériennes. Par exemple, l'insertion d'un élément transposable P affectant l'expression du gène dSCAR, un membre de la famille des WASP (**W**iskott **A**ldrich **S**ynndrome **P**rotein) réduit très fortement la phagocytose par les hémocytes de l'ordre de 60%.

La fonction des plasmatocytes dans la réponse immunitaire est importante, la saturation de la phagocytose grâce à l'injection de billes de latex dans l'adulte n'affecte pas la résistance des mouches aux infections par *E. coli*, mais elle augmente la sensibilité des mutants de la voie *Imd*. Ce résultat est un élément supplémentaire montrant qu'il existe une synergie entre les réponses cellulaires et humorales (Elrod-Erickson et al., 2000).

➤ Récepteurs impliqués dans la phagocytose

Chez la drosophile le génome contient plusieurs récepteurs de type Scavenger.

- Chez l'embryon le récepteur croquemort, un récepteur homologue au CD36 des humains, est comme cette famille de protéines chez les mammifères, nécessaire à la phagocytose des cellules apoptotiques (Franc et al., 1996; Franc et al., 1999).

- Le récepteur DSR-CI (scavenger receptor) reconnaît un large spectre de ligands polyanioniques et est impliqué dans la phagocytose de *E. coli* et *S. aureus* en culture de cellule S2 (Ramet et al., 2001).

- Récemment, des expériences d'ARN interférence en cellules S2 ont montré que le gène CG7228/*peste* (*pes*) code une protéine de type CD36. Peste participe à la phagocytose de *Mycobacterium fortuitum*, *M. smegmatis* et *Lysteria monocytogines* (Philips et al., 2005).

D'autres protéines membranaires impliquées dans la phagocytose soit des corps apoptotiques soit des pathogènes ont été décrites. Le PGRP-LC, en cellules S2 participe à la

phagocytose des bactéries à Gram négatif par les hémocytes (Ramet et al., 2002b). Une protéine réceptrice a été découverte récemment : il s'agit de Draper, dont l'inactivation par ARN interférence diminue la capacité des macrophages à phagocyter les cellules mortes (Pearson et al., 2003).

Les TEPs (ThiolEster containing Protein) sont des protéines de la famille des C3 / α 2 macroglobulines, elles sont au nombre de six chez la drosophile. TEP1 est régulée par la voie des JAK/STAT (Lagueux et al., 2000). L'expression des gènes *tep1*, *tep2* et *tep4* est induite après infection chez la larve, chez l'adulte seuls les deux derniers sont activés (De Gregorio et al., 2001; Lagueux et al., 2000). *tep1*, *tep2* et *tep4* sont aussi exprimés dans les hémocytes et leur expression augmente après infection (Irving et al., 2005). Des approches protéomiques ont montré que TEP2 est retrouvée rapidement dans l'hémolymphe après infection par divers pathogènes (Vierstraete et al., 2004). Une autre étude montre la présence de TEP4 dans l'hémolymphe 72 heures après une infection fongique (Levy et al., 2004).

La fonction des protéines TEPs, chez les insectes, a été mise en évidence chez l'anophèle. L'inactivation par RNAi de TEP1 diminue la capacité des cellules en culture à phagocyter. TEP1 permet l'opsonisation des bactéries, *E. coli* et *S. aureus*, et des ookinètes du *Plasmodium* ce qui active la phagocytose par les macrophages (Levashina et al., 2001; Blandin et al., 2004).

Par homologie avec l'anophèle, les TEPs de drosophile pourraient avoir un rôle d'opsonine facilitant la phagocytose des pathogènes.

b. Les cellules à cristaux dans la mélanisation

Les cellules à cristaux représentent 5 % des hémocytes chez la larve, elles tiennent leur nom des inclusions paracrystallines qu'elles contiennent (Fig. In.16B). Ce sont des cellules non phagocytaires qui ont un rôle dans la mélanisation et qui possèdent les éléments nécessaires à la mélanisation (Meister, 2004). Les infections chez la larve provoquent une prolifération et une différenciation des hémocytes (Lanot et al., 2001; Sorrentino et al., 2002). Les cellules à cristaux pourraient rapidement libérer leur contenu dans l'hémolymphe dont les prophénol-oxydases pour permettre la mélanisation après parasitisme ou après blessure de la larve.

c. Les Lamellocytes : rôle dans l'encapsulation

Les lamellocytes sont de larges cellules plates et adhérentes, ces cellules ne sont pas présentes chez la larve en absence d'infection (Fig. In.16C) (Lanot et al., 2001; Meister et Lagueux, 2003). Elles sont nécessaires à l'encapsulation de gros pathogènes ou parasites tels que des œufs de guêpes qui ne peuvent pas être phagocytés par les plasmatocytes. Il existe une cinquantaine d'espèces d'héminoptères parasites dont *Leptopilina boulardi*, le cycle de développement de ces guêpes dépend du passage par un hôte intermédiaire qui peut être la drosophile. Les guêpes femelles pondent directement dans l'hémocèle des larves. Les œufs parasites vont progressivement se développer au détriment de l'organisme hôte. Ce parasitisme induit chez la larve une prolifération et une différenciation des lamellocytes pour permettre l'encapsulation de l'œuf (Lanot et al., 2001).

La formation de la capsule dépend dans un premier temps de la reconnaissance des parasites par les plasmatocytes circulants. Il y a ensuite une différenciation massive des lamellocytes et des cellules à cristaux. Les lamellocytes vont former une capsule multicellulaire autour du parasite afin de l'isoler du reste de l'organisme. Au cours de processus, il y a noircissement de la capsule associé à la production de mélanine (Meister, 2004). Au sein de la capsule, le pathogène meurt soit par asphyxie soit à cause de molécules réactives produites au cours de la réaction de mélanisation comme les dérivés quinones, les espèces réactives de l'oxygène et les dérivés du NO (Nappi et al., 1995; Nappi et Vass, 1998; Nappi et al., 2000).

De nombreuses souches de guêpes ont développé des mécanismes de résistance à l'encapsulation. Par exemple, afin de prévenir cette dernière, les guêpes femelles injectent au cours de la ponte des particules de type viral dans la larve de drosophile. Ces particules virales vont permettre l'inhibition de la réaction d'encapsulation (Rizki et Rizki, 1990; Labrosse et al., 2005a; Labrosse et al., 2005b).

d. Origine des hémocytes : l'hématopoïèse

Il existe au cours du cycle de vie de la drosophile, deux stades où les hémocytes se différencient au cours de l'embryogenèse puis au cours de la vie larvaire.

➤ **L'hématopoïèse chez l'embryon et la larve**

Chez l'embryon les hémocytes se différencient au niveau du mésoderme proencéphalique, les plasmotocytes, vont migrer dans l'embryon suivant un cheminement et une régulation temporelle très précise. Ces cellules sont nécessaires à l'élimination des corps apoptotiques (Tepass et al., 1994; Franc et al., 1996; Franc et al., 1999). Une deuxième population de cellules apparaît au niveau du proventricule, ce sont les cellules à cristaux dont la fonction à ce stade du développement n'est pas encore élucidée (Lebestky et al., 2000).

Comme pour la migration des cellules chez les mammifères, la migration des hémocytes au cours du développement embryonnaire dépend de Rac1 et Rac2 qui agissent en redondance (Paladi et Tepass, 2004).

A la fin de l'embryogenèse, un organe précurseur de la glande de la lymphe apparaît (Meister et Lagueux, 2003). Chez la larve, la glande de la lymphe est composée d'un nombre variable de paires de lobes et correspond au site de l'hématopoïèse. Les lobes postérieurs contiennent essentiellement les prohémoctes, alors que la région antérieure produit et libère des cellules différenciées. Au moment de la métamorphose, sous le contrôle de l'ecdysone, l'hormone de la métamorphose, la glande de la lymphe dégénère et les hémocytes sont libérés massivement dans l'hémolymphe : les plasmotocytes deviennent macrophages et éliminent les tissus larvaires dégénératifs. Chez la larve, 95% des cellules différenciées sont des plasmotocytes. En plus de leur localisation dans la glande de la lymphe, les hémocytes sont aussi présents dans l'hémolymphe et dans des îlots sessils sous le tégument (Lanot et al., 2001).

Chez l'adulte, les hémocytes s'accumulent au niveau des haltères et des pattes, ils sont aussi retrouvés au niveau du vaisseau dorsal (Lanot et al., 2001; Rutschmann et al., 2002).

➤ **voies de signalisation de l'hématopoïèse**

Les données actuelles montrent une conservation moléculaire des mécanismes de contrôle de l'hématopoïèse entre la drosophile et les mammifères. Les voies de signalisation et facteurs de transcription impliqués dans la prolifération et la différenciation des hémocytes, chez la drosophile, sont présentés en figure In.17.

Par exemple, les GTPases monomériques semblent avoir un rôle dans l'hématopoïèse. Notamment, la voie des Raf/Ras/MAPK intervient dans la multiplication des hémocytes et la différenciation des lamellocytes (Asha et al., 2003).

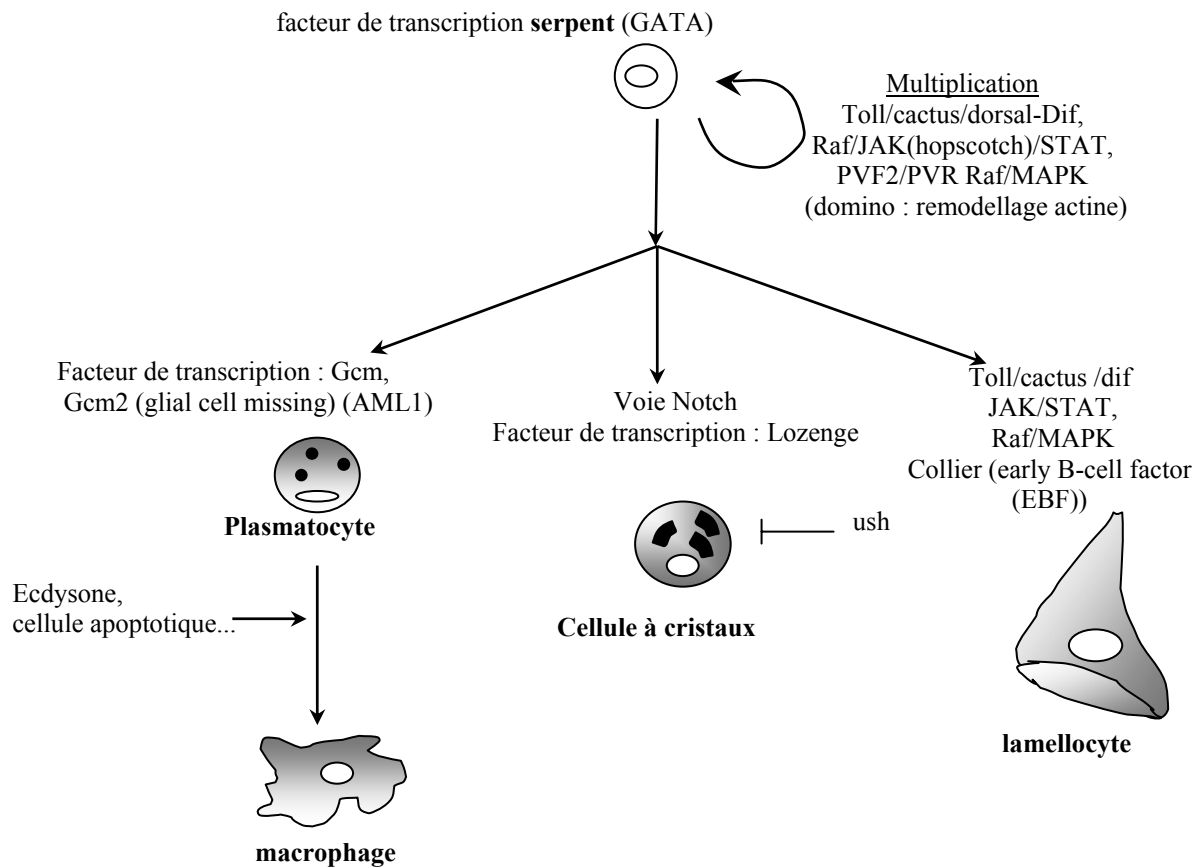


Figure In. 17 : Hématopoïèse chez la drosophile

Il existe une conservation des mécanismes moléculaires avec les mammifères tels que les facteurs GATA, GCM, Notch.... L'homologue du PDGFR/VEGFR, PVF2 a un rôle dans la multiplication des pro-hémocytes (Munier et al., 2002). La surexpression de la voie des Raf/MAPK par l'intermédiaire de Ras donne un phénotype comparable (Asha et al., 2003). La suractivation de la voie Toll (Toll^{10B} : mutant gain de fonction) ou de JAK/STAT (hop¹⁰ : gain de fonction) conduit à une augmentation du nombre d'hémocytes et à la prolifération des lamellocytes (Luo et al., 1995; Qiu et al., 1998). Récemment le facteur collier (homologue du early B-cell factor (EBF) des mammifères) a été décrit comme participant à la différenciation des lamellocytes : la mutation *coll* empêche la différenciation des lamellocytes après parasitisme (Crozatier et al., 2004). Les facteurs de transcription impliqués dans la prolifération ou différenciation possèdent en général des homologues chez les mammifères : Gcm et Gcm2 (Glial cell missing) (Lebestky et al., 2000; Alfonso et Jones, 2002), le facteur de transcription de la famille GATA serpent, le facteur de la famille Runx1, Lozenge (Lebestky et al., 2000). La voie Notch régule l'apparition des cellules à cristaux (Duvic et al., 2002).

La surexpression de la Rho GTPase Rac1 induit une surprolifération des lamellocytes ainsi qu'une légère augmentation du nombre total d'hémocytes. Alors que l'expression d'une forme dominante négative de cette protéine est à l'origine d'une diminution significative du nombre de cellules à cristaux. La voie des JNK pourrait être impliquée dans l'hématopoïèse, la surexpression de *hemipterous* (JNKK) active très fortement la production de lamellocytes ; alors que la surexpression de AOP (Anterior **O**pen), un répresseur de la transcription, induit une prolifération des hémocytes surtout une très forte prolifération des lamellocytes. Les auteurs de cette étude suggèrent aussi un rôle de Rac1 dans la régulation de la voie des JNK au cours de la différenciation des lamellocytes (Zettervall et al., 2004).

Une Rho GTPase atypique, RhoL est exprimée dans les précurseurs des hémocytes. Dans les embryons mutants *RhoL*, les prohémocytes commencent à se développer normalement mais les cellules ne deviennent jamais matures (Sasamura et al., 1997).

Chez la larve, Rac2 est exprimée dans les hémocytes circulants ainsi que dans la glande de la lymphe. Son expression dans les cellules circulantes n'est pas modifiée en cas d'infection. L'expression de Rac2 dans les plasmatocytes de l'hémolymphe est augmentée si la voie JAK(Janus kinase)/STAT ou la voie Toll est constitutivement activée grâce à des formes dominantes positives *hop^{tum1}*(JAK) ou *Toll^{10B}* respectivement (Irving et al., 2005).

5. La réponse épithéliale

Les épithélia tels que les épidermes intestinaux et génitaux, la trachée, susceptibles d'être en contact direct avec les pathogènes sont capables d'exprimer de manière constitutive des peptides antimicrobiens. En cas d'infection par ingestion, l'expression des peptides antimicrobiens est localement induite par une voie dépendante de Imd (Ferrandon et al., 1998; Tzou et al., 2000).

L'épithélium intestinal aurait aussi un rôle dans la production d'espèces réactives de l'oxygène et de NO, dont le rôle dans la réponse immunitaire a été décrit précédemment.

6. Implication du NO et des espèces réactives de l'oxygène dans la réponse immunitaire

L'implication du NO dans la réponse immunitaire a été partiellement décrite dans les chapitres précédents. De plus, chez la larve, suite à un parasitisme par des œufs de guêpes de *Leptopilina Boulardi*, des espèces réactives de l'oxygène (H_2O_2 et $O_2^{\cdot -}$) et des dérivés du NO participent à l'encapsulation du parasite. Des espèces réactives de l'oxygène sont produites par les hémocytes, les lamellocytes produisent du NO pouvant avoir un effet toxique (Nappi et al., 1995; Nappi et Vass, 1998; Nappi et al., 2000).

Plusieurs données suggèrent l'existence d'une production des espèces réactives de l'oxygène au cours de la réponse immunitaire chez la drosophile. Le gène CG8913 prédit comme ayant une activité peroxydase, est exprimée après infection (De Gregorio et al., 2001; Irving et al., 2001). Récemment, il a été montré que CG8913 appelé aussi IRC (Immune Regulated Catalase) qui permet la détoxification du peroxyde d'hydrogène, est exprimé de manière constitutive dans divers organes dont l'intestin. Des individus infectés par ingestion de milieu contaminé sont plus sensibles si le gène CG8913 est inactivé par RNAi, la concentration en espèces réactives de l'oxygène augmentant dans ces mouches par rapport au individus sauvages, suggérant une production d'espèces réactives de l'oxygène en réponse à l'infection (Ha et al., 2005). Il existerait donc chez la mouche comme chez les mammifères, un équilibre entre la production et l'élimination des espèces réactives de l'oxygène au cours de la réponse à un stress infectieux.

Un déséquilibre dans cette régulation entraîne un stress oxydant. La tolérance des drosophiles aux espèces réactives de l'oxygène dépend notamment de la voie des JNK qui contrôle des gènes codants des protéines ayant une fonction d'antioxydant (Boutros et al., 2002; Wang et al., 2003). Le stress oxydant active aussi de nombreux mécanismes de réponse aux stress qui présentent des similitudes avec la réponse immunitaire. Il existe en effet une corrélation d'expression pour certains gènes de la réponse immunitaire également exprimés en réponse à un stress oxydant (Girardot et al., 2004).

➤ La NADPH oxydase chez la drosophile

Aucune activité NADPH-oxydase n'a encore été décrite chez la drosophile.

Il existe un gène codant une protéine qui pourrait posséder une activité NADPH-oxydase, il s'agit de CG3131 (Fig. In.18A). L'étude de sa séquence montre la présence d'un domaine peroxydase, des motifs EF hand et d'un domaine NADPH oxydase. Ces différents domaines suggèrent une similitude avec les protéines DUOX (**D**ual **O**xidase) des mammifères, présentes notamment dans le colon et la thyroïde. Ces DUOX permettent la synthèse d' H_2O_2 par dismutation directe ou non des ions superoxydes. Chez les mammifères, la présence des protéines DUOX dans l'épithélium bronchique, la trachée et les glandes salivaires pour la production d' H_2O_2 a été interprétée comme une fonction possible de cette enzyme dans les mécanismes de défense (Geiszt et Leto, 2004). Une hypothèse serait que le H_2O_2 produit par les protéines DUOX servirait de substrat à la lactoperoxydase et à son propre domaine peroxydase pour aider à l'élimination locale des pathogènes en produisant de l'acide hypochlorite (HCOCl) à partir de l' H_2O_2 et d'ions chlorure (Lambeth, 2004).

CG3131 possède un homologue chez l'anophèle, Ag-DUOX (ensangg 00000006017). Chez l'anophèle, l'invasion de l'intestin par des ookinètes du *Plasmodium berghei* active la transcription des DUOX probablement pour induire une production locale d'ions superoxydes (Kumar et al., 2004). Chez l'anophèle, les souches réfractaires aux infections par *Plasmodium* ont une plus forte concentration basale en H_2O_2 dans l'hémolymph que les souches sensibles. Ces lignées réfractaires produisent dans l'hémolymph des ions superoxydes en réponse à l'ingestion de sang contaminé ou non. Dans ces souches, les espèces réactives de l'oxygène auraient un rôle dans la mélanisation et dans l'encapsulation des ookinètes du *Plasmodium* (Kumar et al., 2003).

Nous avons recherché dans le génome de la drosophile par BLAST, des homologues des sous-unités p40phox, p47phox et p60phox de la NADPH-oxydase phagocytaire (NOX2) des mammifères : aucun gène orthologue n'a été identifié. La présence de protéines similaires ne peut cependant pas être exclue.

Chez la drosophile aucun autre gène n'a été prédit comme ayant une fonction NADPH-oxydase. Néanmoins le gène CG3896, prédit comme codant une oxydoréductase, possède des homologies avec les protéines NOX5 avec notamment la présence des EF-hands dans sa partie N-terminale (Fig. In.18B). Comme les NADPH-oxydases, elle possède un domaine transmembranaire de type réductase ferrique, elle pourrait donc correspondre à une NADPH-oxydase de type NOX.

Récemment, Bergin et coll. (2005) ont montré que les hémocytes de *Galleria mellonella* expriment une NADPH-oxydase homologue à la NADPH-oxydase présente dans les neutrophiles de mammifères. Comme son homologue des mammifères, elle est nécessaire à la production d'ions superoxydes et à la destruction des pathogènes (Bergin et al., 2005).

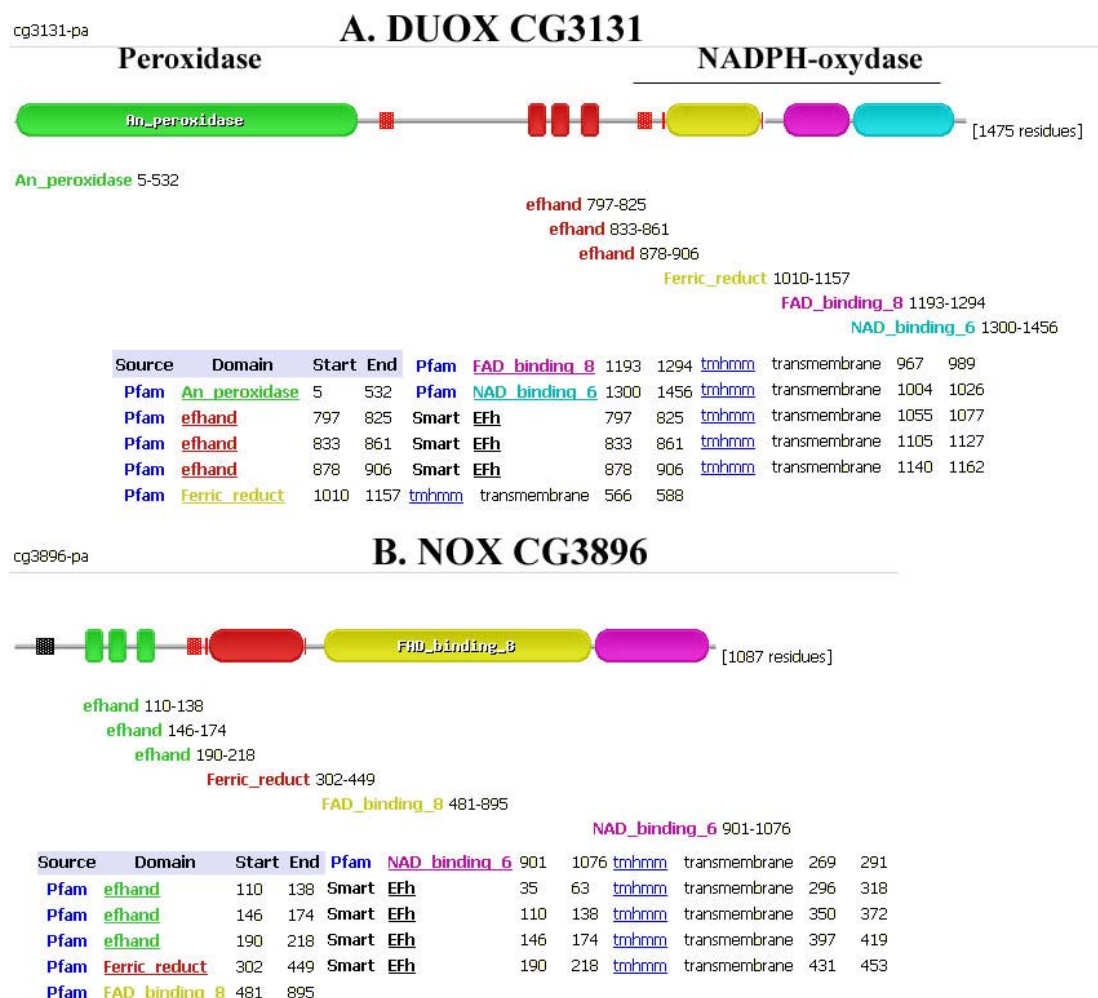


Figure In. 18 : Organisation de la protéine codée par CG3131 (DUOX) (A) et CG3896 (NOX) (B) d'après Pfam protein domain database (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>)

Le gène CG3131 possède deux domaines fonctionnel un domaine peroxydase et un domaine NADPH-oxydase. Il s'agit d'une protéine à 6 domaines transmembranaires.

An_peroxidase : peroxydase animale à hème (homologie avec le précurseur de la peroxydase thyroïdienne)

Efhand : EF-hand, liaison au Ca^{++}

Domaine de la NADPH-oxydase :

Ferric-reductase : domaine transmembranaire à activité ferrique réductase

Fad_binding_8 : domaine de liaison au FAD ferredoxine réductase (Ferredoxin reductase FAD binding domain)

Nad_binding_6 : Ferric reductase-like NAD binding domain

IV. Objectifs

Les travaux réalisés au laboratoire sur le système de sécrétion de type III en utilisant la drosophile comme modèle d'étude des infections par *P. aeruginosa*, ont montré l'implication de ce système de virulence dans sa pathogénicité chez la mouche. Ces résultats ont conduit l'équipe à entreprendre l'étude des toxines de type III par transgénèse chez la drosophile comme modèle. Afin de valider cette approche, je me suis plus particulièrement intéressée à la toxine ExoS et à son domaine GAP (ExoSGAP) sachant que ce domaine, dans les cellules en culture, affecte la morphologie cellulaire en ciblant les Rho GTPases.

Le but de ma thèse a été d'identifier les processus de la réponse immunitaire et des voies de signalisation affectées par ExoSGAP. J'ai élargi cette étude en recherchant des gènes communs impliqués soit dans la réponse immunitaire soit dans la réponse au stress oxydant.

J'ai, dans un premier temps, utilisé des lignées transgéniques permettant l'expression inductible et tissu-spécifique de domaine GAP d'ExoS afin d'étudier les effets spécifiques de cette toxine sur la réponse immunitaire dans un organisme entier.

J'ai en parallèle cherché à déterminer par des approches de génétiques classiques, certaines des protéines cibles de la toxine. Pour cela, je me suis servie du fait que l'expression d'ExoSGAP induit des défauts morphogénétiques dans l'œil ou dans l'aile, pour identifier des gènes endogènes de la drosophile dont la dérégulation modifie ce phénotype.

Suite aux résultats obtenus avec ExoSGAP, je me suis intéressée à l'étude des Rho GTPases dans la réponse immunitaire de la drosophile et plus particulièrement à Rac2.

L'équipe du Dr. H. Tricoire (Institut Jacques Monod, Paris) a réalisé un crible par mutagenèse de dérégulation pour identifier des gènes impliqués dans la résistance au stress oxydant. Ils ont ainsi isolé 180 lignées présentant soit une résistance soit une sensibilité au stress oxydant (Monnier et al., 2002a; Monnier et al., 2002b). J'ai criblé 105 de ces lignées sur le critère de résistance ou sensibilité aux infections par *P. aeruginosa*, afin d'identifier de nouveaux gènes de la réponse immunitaire de la drosophile et de mettre en évidence une corrélation possible entre la réponse aux deux stress oxydant et infectieux. En effet, le stress oxydant modifie l'expression de nombreux gènes, dont certains sont aussi régulés au cours de la réponse immunitaire dont certains peptides antimicrobiens (Girardot et al., 2004).

PARTIE II

MATERIELS ET METHODES

I. culture bactérienne

1. Souches bactériennes et méthode d'infection.

a. Souches bactériennes, conditions de culture et d'infection

Pour l'étude sur ExoSGAP, les souches de *P. aeruginosa* de référence sont la souche sauvage CHA issue d'un isolat clinique (Toussaint et al., 1993) et la souche mutante CHA-D1 (mutant CHA*exsA::Gm*) notée CHA::*exsA* qui contient une insertion dans le gène *exsA* qui code pour l'activateur de transcription du SSTT (Dacheux et al., 1999). Pour les autres tests en infection, la souche de référence PAO1, dont le génome a été séquencé, est utilisée. Afin d'avoir une cinétique plus lente, la souche PAO1 non cytotoxique qui est notamment déficiente pour le SSTT, sert aussi pour les infections (Ina Attrée, communication personnelle). Trois heures avant infection, des cultures de *P. aeruginosa* sont ensemencées dans la proportion de 40 µl d'une culture en phase stationnaire pour 3 ml de LB (Luria Broth). Les cultures de trois heures à 37°C sont en phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm}=0,8-1$), elles sont ensuite diluées deux fois dans du LB stérile ($DO_{600nm}=0,4-0,5$) ou dans du PBS stérile ($DO_{600nm}=0,4$). Les cultures en phase exponentielle de croissance permettent une activation plus rapide des systèmes de virulence bactériens comme le système de sécrétion de type III. Les souches de *P. aeruginosa* sont cultivées sur des boîtes PIA (*Pseudomonas* Isolation Agar; DIFCO) à 37°C. La souche CHA::*exsA* est cultivée sur boîtes PIA contenant l'antibiotique gentamicine (400 µg/ml).

En culture liquide en milieu LB, la concentration est estimée par la densité optique (DO) à 600nm, une DO_{600nm} de 1 correspond à 6.10^8 bactéries *P. aeruginosa*/ml.

Les autres souches bactériennes sont utilisées sous forme d'un culot bactérien de culture en phase stationnaire de croissance. Différentes souches de bactéries à Gram négatif sont utilisées dont *Agrobacterium tumefaciens*, la souche de *Escherichia coli* non pathogène DH5α et pathogène *Escherichia coli* 1106, *Enterobacter cloecae*. Les souches bactériennes à Gram positif sont *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus*. Toutes les souches sont cultivées sur des boîtes LB-agar à 37°C sauf pour *A. tumefaciens* à 30°C. En milieu liquide, les bactéries sont ensemencées dans 50 ml de milieu LB et laissées la nuit sous agitation (200-300 rpm). Avant infection, les bactéries sont centrifugées 15 minutes à 3000 rpm. Le culot bactérien est récupéré et sert à l'infection.

Pour chaque expérience, au minimum 30 individus, de même sexe, âgés de cinq à neuf jours, sont infectés par piqûre septique au niveau du thorax à l'aide d'une aiguille d'entomologiste préalablement plongée dans la solution bactérienne. Après infection, les individus sont répartis par groupes de dix mouches et placés à 25°C.

Pour les infections par ingestion, les cultures de *P. aeruginosa* en phase exponentielle de croissance sont diluées à une DO_{600nm} de 0,2 dans du sucrose 5% stérile. 2 ml de cette solution sont déposés dans des tubes de culture de drosophiles contenant du papier absorbant, les mouches sont ensuite réparties par groupe de 15 dans chaque tube. Les drosophiles sont transférées tous les trois jours dans des tubes propres contenant un milieu surose 5% avec *P. aeruginosa* afin d'éviter des contaminations et de renouveler l'apport alimentaire. L'infection s'effectue à 25°C.

b. Conservation des souches bactériennes

Les souches sont conservées à -80°C soit dans leur milieu en présence de 40% de glycérol soit sur des billes poreuses.

2. Mesure de la croissance bactérienne

La croissance des bactéries de *P. aeruginosa* est mesurée à partir de mouches infectées comme décrit dans Fauvarque et coll. (2002). Pour chaque temps, trois groupes de cinq mouches sont placés dans des tubes de 1,5 ml, maintenus sur glace. Les mouches sont ensuite écrasées en présence de 200 µl de LB, le volume est ensuite ajusté à 400 µl. La suspension bactérienne est ensuite centrifugée à 4°C à 1 500 rpm pendant 10 min afin de séparer les bactéries des débris cellulaires. Le surnageant est ensuite dilué en série et étalé sur des boîtes PIA. Le lendemain la croissance bactérienne est évaluée en comptant le nombre de colonies de CHA formées (CFU : Colony Forming Unit) ramené à l'équivalence pour une mouche. Dans cette expérience, les cultures de CHA sont préalablement diluées à une DO_{600nm} de 0,1 afin d'avoir une multiplicité d'infection de 5 à 20 bactéries par individu.

II. Génétique de la drosophile

1. Souches de drosophiles et croisements

Les lignées mutantes *yw,Rac1J10*, *yw,Rac1J11,FRT2A* et *Rac2^A,ry⁵⁰⁶* ont été transmises par le Dr Luo (Hakeda-Suzuki et al., 2002; Ng et al., 2002). Les lignées UY (P[Mae-UAS.6.11], P[y⁺,UAS]) pour la mutagenèse de dérégulation ont été transmises par

l'équipe de Dr H. Tricoire. Les lignées EP partenaires de GAP(84C) ainsi que la majorité des autres lignées ont été commandées auprès du «bloomington drosophila stock center »ou auprès de « EP fly station ». Les caractéristiques de ces lignées sont disponibles sur le site de flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu>). La lignée inductrice *yolk-Gal4* permettant l'expression dans le corps gras a été donnée par le Dr D. Ferrandon (IBMC, Strasbourg) (Georgel et al., 2001). Les lignées *srpD37-2Gal4* (*serpent-Gal4* notée *srp-Gal4*) (Crozatier et al., 2004) et *crq 17-3-Gal4* (*croquemort-Gal4* notée *crq-Gal4*) ont été transmises par le Dr M. Meister (IBMC, Strasbourg). Les autres lignées de drosophiles inductrices exprimant le facteur Gal4 sous le contrôle d'un promoteur tissu-spécifique sont *GMR-Gal4* (*GMR-Gal4*) qui permet l'expression du facteur en arrière du sillon morphogénétique de l'œil, *en-Gal4* (*engrailed*) et MS1096 qui permettent une expression du facteur Gal4 au cours du développement de l'aile dans les disques imaginaux, soit dans la partie postérieure, soit dans l'aile entière, respectivement. *da-gal4* (*daugtherless*) permet une expression dans l'ensemble des cellules. *HS-Gal4* (*heat-shock*) permet l'expression dans l'ensemble des cellules après choc thermique . La construction des lignées transgéniques UAS-Rac2 et UAS-ExoSGAP est exposée plus loin. Le principe de l'expression tissu spécifique avec le système UAS-Gal4 est présenté dans la partie « résultats » de ce manuscrit.

Les mouches sont maintenues sur milieu standard à 18°C ou 21 °C. Le milieu nutritif est composé de 8,3 % de maïs, de 8,3 % de levure comme source protéique, 1,1 % d'agar, 0,5 % de moldex (10 % methyl hydroxy benzoate dissout dans l'éthanol 100%). Pour la microinjection, le milieu de ponte est composé de 3,2 % de bactoagar, 3,2 % de saccharose et 3,2 % de vinaigre de vin.

Pour les croisements en tube de culture de drosophiles, 6 à 7 femelles sont croisées avec 5 à 6 mâles. Pour les croisements en masse en bouteille de culture de drosophiles, 30 à 50 femelles sont croisées avec 20 à 40 mâles. Les croisements sont effectués à 25°C sauf indications.

2. Recombinaison méiotique chez la drosophile

La recombinaison permet de mettre sur un même chromosome des gènes normalement situés sur les deux chromosomes de la même paire. Chez la drosophile, les phénomènes de recombinaison méiotique ne se produisent que chez les femelles. Les croisements successifs à 25°C effectués sont décrits en figure M.1. Pour chaque recombinaison, au minimum 10 lignées indépendantes sont obtenues.

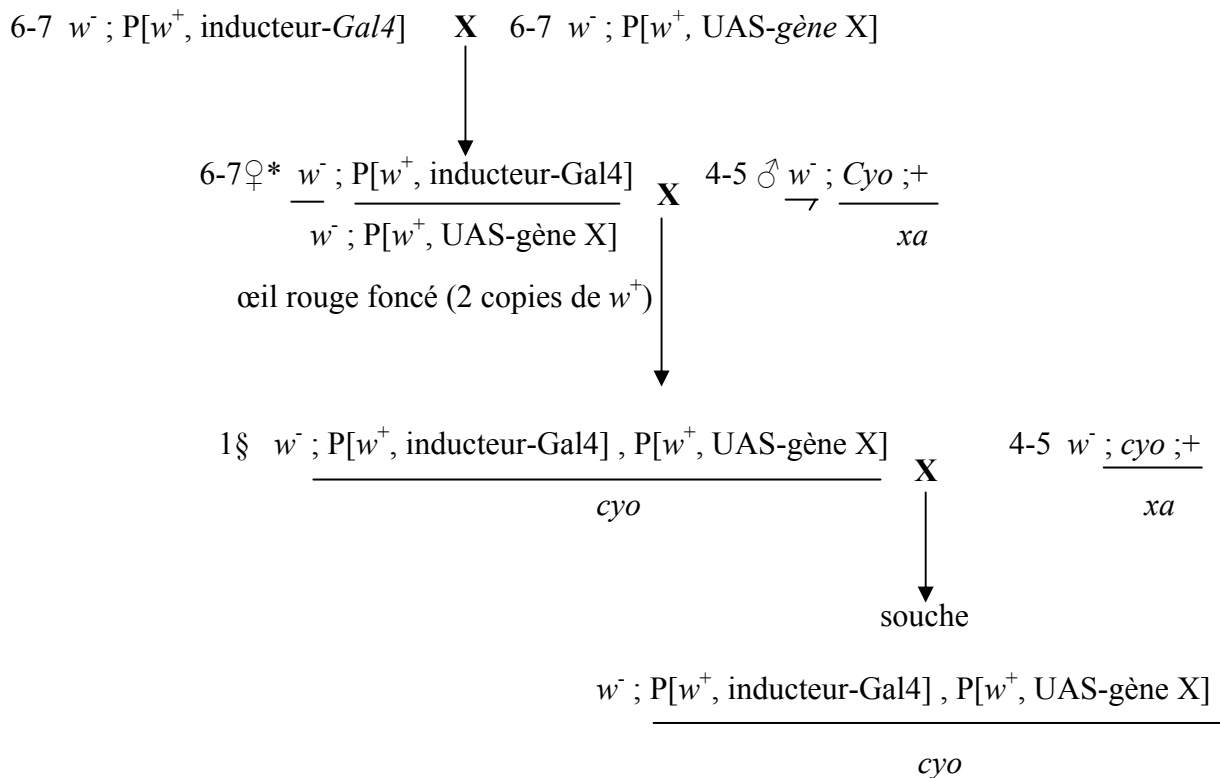


Figure M. 1 : Principe de la recombinaison méiotique chez la drosophile (exemple d'une recombinaison sur le chromosome II)

cyo : chromosome balancier ne permettant pas de recombinaison pour le chromosome II, portant le gène dominant Curly (Cy) (aile courbe). *xa* : chromosome balancier des bras droits des chromosome II-III (aile coupée). La recombinaison consiste à associer sur le même chromosome deux gènes ou éléments P de deux lignées de drosophiles.

Il peut y avoir plusieurs événements de recombinaison différents dans les cellules germinales d'une même femelle (*), d'où l'utilité de construire des lignées indépendantes à partir d'un seul individu (§)

3. Construction de lignées transgéniques (Rubin et Spradling, 1983)

a. Clonage du gène d'intérêt dans le vecteur pUAS_T

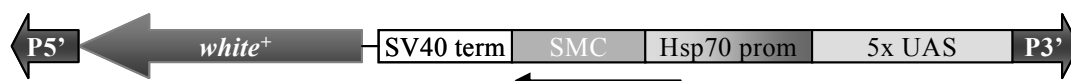


Figure M. 2 : Structure du transposon P[UAS]_T

Marqueur : *white*⁺ (œil rouge), SMC : site multiple de clonage pour l'insertion du transgène, HSp70 promoteur minimum, UAS : 5 copies des séquences de fixation de Gal4, SV 40 term : signal de polyadénylation du virus SV40. P5' et P3' : pied du transposon

Pour construire des lignées transgéniques permettant l'expression inductible grâce au système UAS-Gal4, le gène d'intérêt est cloné en aval des séquences UAS au sein d'un élément transposable P déficient en transposase, il n'est pas mobilisable spontanément.

Le plasmide vecteur pP[UAS]T (Fig. M.2) qui contient le gène de résistance à l'ampicilline est utilisé pour la transgénèse (Brand et Perrimon, 1993). Il possède une origine de répllication bactérienne, un gène de résistance à l'ampicilline et le transposon P[w⁺,UAS] contenant le gène marqueur w⁺ et les séquences UAS suivies d'un site de clonage.

b. Clonage d'ExoSGAP et Rac2

Les lignées transgéniques UAS-ExoSGAP ont été construites par Evelyne Bergeret et Marie-Odile Fauvarque. ExoSGAP a été amplifié par PCR à l'aide des amorces sens 5'-ggggtaccctaaccaaacATGCATATTCAATCGCTTCAGCAG (en minuscule site de restriction de l'enzyme *KpnI*) et antisens 5'-gctctagagcCCCAAGGTGTCCGTTCGTGA (en minuscule site de restriction de *XbaI*).

Pour le clonage de *Rac2*, nous sommes partis du cDNA cloné dans le vecteur pOT₂ (EST : GM13874) commandé auprès du centre DGRC (Drosophila Genomics Resource Center, <http://dgrc.cgb.indiana.edu>). Le plasmide a été amplifié et purifié suivant le protocole fourni par le DGRC en transformant les bactéries *E. coli* DH5α (Max efficiency, Invitrogen).

L'ADNc de *Rac2* est extrait par une digestion par *EcoRI* (0,33 U/μL, Roche) et *XhoI* (0,66 U/μL, Roche) pendant deux heures à 37°C. Parallèlement, le vecteur pUAS_T est digéré dans les mêmes conditions. L'insert *Rac2* et le vecteur pUAS_T digérés sont purifiés sur gel d'agarose 0,8% (TAE 1X) à l'aide du kit DNA Gel Extraction (Millipore). La ligation a été effectuée dans des proportions vecteur / insert de 1 pour 3, en présence d'une unité de T4 DNA ligase (1 U/μL, Roche) à 16°C sur la nuit. Des bactéries compétentes d'*E. coli* DH5α (Max efficiency, Invitrogen) sont ensuite transformées selon le protocole du fournisseur. La sélection des bactéries transformées se fait sur milieu LB-agar contenant de l'ampicilline (100 μg/ml). Les clones sélectionnés sont réensemencés dans 3 mL de LB, ampicilline 100 μg/ml. Le lendemain, le plasmide est purifié grâce au kit « miniprep purification kit » (sigma).

La présence et la séquence de l'insert est confirmé par séquençage par la société « génome express » (Meylan, France).

Le plasmide est ensuite amplifié en grande quantité à l'aide du kit midiprep (Quiagen).

c. Microinjection d'embryons au stade blastoderme syncitial et obtention des lignées transgéniques

Avant l'injection, 10,5 μg de vecteur avec insert et 4,5 μg de plasmide Helper Δ2-3 (source de transposase) sont coprécipités puis repris dans 30 μl de tampon d'injection (0,1mM Na phosphate pH=7,8 et 5mM KCl). Une faible quantité d'ADN est ensuite injectée dans des

embryons w^{1118} déchorionnés au stade blastoderme syncitial au pôle germinal avec des capillaires Femtotips 2 (Eppendorf) à l'aide du Microinjecteur 5242 (Eppendorf) (Pression $P1=5000$ Pa, $P2\leq 2000$, $P3\leq 115$, temps injection = 0,1-0,5 secondes). Afin d'éviter que les embryons ne se dessèchent, ils sont recouverts d'huile minérale 10S (Voltatef, Prolabo). Après injection, ils sont placés dans des lames à dépression et sont recouverts d'huile minérale 3S (Voltatef, Prolabo). Les larves survivantes sont placées dans des tubes de culture de drosophile.

Les adultes survivants sont croisés individuellement avec des individus de la lignée parentale w^{1118} . La descendance est criblée pour la présence des yeux colorés liée à l'insertion du transgène possédant le gène *white* sauvage. Les adultes possédant le transgène, sont croisés de manière indépendante avec des individus de la souche parentale pour établir des lignées transgéniques indépendantes. Le chromosome d'insertion est déterminé par croisement avec des lignées possédant des chromosomes balanciers pour les différents chromosomes. Nous avons pu ainsi obtenir des lignées transgéniques avec des insertions sur chacun des chromosomes.

III. Détermination du site d'insertion de l'élément P[y+,UAS] dans le génome (UY) par PCR inverse

Selon le protocole de BDGP (www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html) et le protocole transmis par le Dr H. Tricoire (Institut Jacques Monod, Paris) (Fig. M.3).

1. Purification de l'ADN génomique

L'ADN génomique est préparé à partir de cinquante mouches d'une lignée UY donnée préalablement congelées à -80°C . Les mouches sont broyées dans 500 μl d'une solution A (100 mM Tris HCl pH7.5, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5% SDS), le mélange est incubé 30 min à 70°C . Les protéines et débris cellulaires sont éliminés par précipitation en présence de 70 μl de KAc (Acétate de potassium) 8 M pendant 30 min dans la glace. Après deux centrifugations de 15 min à 14 000 rpm le surnageant contenant l'ADN est récupéré. L'ADN est ensuite repris dans 100 μl d'eau.

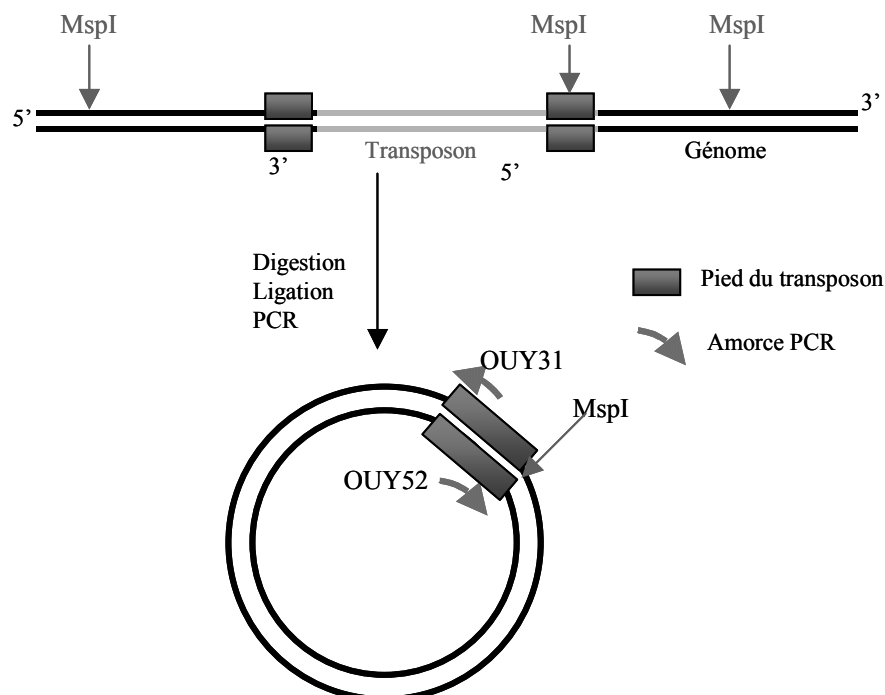


Figure M. 3 : Principe de la PCR inverse.

L'ADN génomique est dans un premier temps digéré par *MspI*, puis les fragments obtenus sont ensuite reliés ce qui permet aux fragments la circularisation, les réactifs étant très dilués.

La PCR est réalisée avec les amorces OUY31 et OUY52 hybridant dans le pied 5' du transposon.

2. Digestion et circularisation des fragments d'ADN génomique

20 µl d'ADN sont digérés pendant une nuit par 10 unités de l'enzyme *MspI* dont les sites de restriction sont fréquents dans le génome, ce qui génère des petits fragments, cette enzyme coupe également dans le pied 5' du transposon.

Après inactivation de l'enzyme, l'ADN est précipité en présence de 1 µl de glycogène et repris 88 µl d'eau. La ligation des fragments est réalisée pendant une nuit à 16°C avec 2 unités de la ligase T4 (Roche). L'ADN est à nouveau précipité en présence de glycogène et le culot est dissout dans 20 µl d'eau.

3. PCR (polymerase chain reaction)

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est effectuée à partir de 2 µl de la ligation. Le milieu de PCR contient 200 µM de dNTP (déoxy nucléotides triphosphates) (Quantum), 2,5 µM d'amorce OUY31 sens (5'ATTGATTCACCTTAACTTGCAC3'), 2,5 µM d'amorce OUY52 antisens (5'ACACAACCTTTCCTCTCAACAA3'), et la polymérase TITANIUM

(Clontech) diluée au 1/50^{ème}. La PCR se déroule en plusieurs étapes : une première phase de dénaturation de 2 minutes à 92°C, suivie de 30 cycles composés d'une phase de dénaturation de 5 secondes à 89°C et 10 secondes à 92°C, puis d'une phase d'hybridation de 45 secondes à 60°C et d'une phase d'élongation de 2 minutes à 68°C. La PCR finit par une phase d'élongation de 2 minutes à 68°C.

Les fragments PCR sont purifiés sur gel (DNA gel extraction kit, Life Science) puis séquencés (Génome Express).

Les séquences obtenues permettent d'identifier les gènes correspondants par BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) par rapport au génome de *Drosophila melanogaster* (<http://flybase.bio.indiana.edu/>).

IV. Analyse de l'expression des gènes

1. analyse quantitative de l'expression des gènes par Northern blot

a. Extraction des ARNs totaux de la mouche

Les ARNs totaux sont préparés à partir de 20 mouches broyées dans du RNA-Plus, les ARN sont ensuite extraits, selon le protocole du fournisseur (QBiogen) puis resolubilisés dans de l'eau traitée au DEPC (Diethyl pyrocarbonate). Les ARNs sont dosés en mesurant la densité optique à une longueur d'onde de 260 nm.

b. Gel de Northern et migration

15 µg d'ARN dans du tampon (MOP 1X (3-[N-morpholino] propane sulfoniacide + 10 mM EDTA), formamide 38%, formaldéhyde 5%) sont préalablement chauffés à 65°C pendant 15 minutes puis ajoutés de BET (bromure d'éthidium) et de tampon de charge. Ils sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 1,2% dénaturant (MOPS 1X, formaldéhyde 6%). La migration s'effectue à 75 V dans du tampon MOPS 1X. Les ARN sont transférés sur une membrane de nylon Hybond-XL (Amersham Biosciences) dans du tampon SSC 20X (Saline Sodium Citrate, NaCl 3M, citrate de Sodium 0,3M pH 7). Après transfert, les ARNs sont fixés sur la membrane aux ultraviolets (0,120 J/cm²).

c. Préparation des sondes marquées ³²P par random priming

Les sondes sont préparées par random priming à l'aide du kit High prime labelling kit (Roche) selon le protocole du fournisseur à partir de 150 à 200 ng de produits PCR purifiés ou

à partir 50 à 100 ng de fragments d'ADNc (DGRC, Bloomington) (Tab. M.1). La préparation de la sonde [α^{32}]dCTP se fait à 37°C pendant 45 minutes à 1 heure. La réaction de synthèse est arrêtée avec 50 μ l de TE (Tris EDTA pH=8).

Sonde	Source des ADN utilisés pour synthétiser les sondes
<i>Actine42A</i>	PCR à partir d'ADN génomique ou RT-PCR à partir des ARNm (1,2 kb) -Amorce sens : accgcgtgcgagtttt -Amorce antisens : tatggttgcttatgcgtcgtga
<i>Attacine</i>	PCR à partir d'ADN génomique ou RT-PCR à partir des ARNm (863 pb) -Amorce sens : ttaccgaggcacttcacaaac -Amorce antisens : gggcgatgaccagagtagca
<i>sulfated (sulf 1)</i>	A partir cDNA obtenu par RT-PCR (990 pb) -Amorce sens : caaagcaccctggagatcttg - Amorce antisens : cctccaggtgattctggtgctg
<i>Puckered (puc)</i>	A partir du cDNA cloné dans pOT2 (source DRGC) Digestion par EcoRI (2,9 kb)
<i>Diptéricine</i>	A partir cDNA cloné dans pBluescript (Dr D. Ferrandon, IBMC Strasbourg) Digestion par NotI, XhoI (1,7 kb)
<i>Drosomycine</i>	A partir cDNA cloné dans pBluescript (Dr D. Ferrandon, IBMC Strasbourg) Digestion par NotI, XhoI (376 pb)

Tableau M. 1 : Sources des matrices d'ADN pour préparer les sondes marquées ^{32}P .

Les produits de digestion ou de RT-PCR sont ensuite purifiés sur gel d'agarose 0,8-1% TAE 1x (tampon Tris acétate EDTA) à l'aide du kit d'extraction JETQuick selon le protocole du fournisseur (Genomed).

d. Hybridation du Northern blot

La membrane est hybridée avec des sondes marquées au ^{32}P . Après lavage de la membrane, l'expression des gènes d'intérêt est quantifié grâce au PhosphoImager (Bio-Rad).

Les hybridations sont faites séquentiellement avec des sondes ^{32}P ADNc (Tab. M1). L'actine sert de contrôle interne et de normalisateur (témoin de charge).

2. Analyse qualitative de l'expression des gènes par RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

L'expression des gènes peut aussi être évaluée par RT-PCR, technique qui consiste à synthétiser des ADNc (ADN complémentaire) grâce à la transcriptase reverse à partir des ARNm. L'ADNc est ensuite amplifié par PCR classique.

Avant RT-PCR, l'ADN pouvant contaminer les préparations d'ARNs est éliminé grâce au kit DNA-free (Ambion). Les préparations d'ARNm sont ensuite dosées en mesurant l'absorbance à 260 nm et diluées à 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Les RT-PCRs sont effectuées à l'aide du kit One-Step RT-PCR Titanium (Clontech) selon le protocole du fournisseur, à partir de 1 μg d'ARN (pour les amorces, voir précédemment). Les produits de la RT-PCR sont observés après migration sur gel d'agarose 0,8 % en TBE 1x (tampon Tris borate EDTA).

V. Test de phagocytose et étude des hémocytes

La phagocytose chez la drosophile peut-être approchée de deux façons, *in vivo* en adulte, ou *ex vivo* à partir d'hémocytes isolés des larves.

1. phagocytose *in vivo*

Les tests de phagocytose *in vivo* se déroulent comme décrit par Erlod-Erickson et al. (2000) et Rutschmann et al. (2002). Des individus âgés de plus de trois jours ont été injectés au niveau du thorax avec 82,1 nl (ou 345 nl pour les expériences de saturation) de bioparticules couplées à la fluorescéine issues de bactéries à Gram négatif (*E. coli K12* fluorescein conjugated, 20 mg/ml, molecular probes) à l'aide d'un microinjecteur Nanoject (Drummond Scientific, Broomall, PA). Afin d'avoir un niveau de phagocytose suffisant, les mouches sont maintenues 30 à 40 minutes à 25°C. La fluorescence des particules non phagocytées est stoppée en injectant les mouches avec 480 nl de bleu de trypan 0,4% (Sigma) qui diffuse dans l'ensemble de l'organisme. Le bleu de trypan ne pénètre pas les cellules vivantes, donc les particules phagocytées sont protégées de l'action du colorant. La phagocytose des bactéries est observée dans l'abdomen essentiellement au niveau dorsal à la loupe binoculaire (Leica MZ FLIII) et les photographies sont prises avec une caméra numérique (LEICA, DC300F) à l'aide du logiciel d'acquisition d'image IM50.

2. phagocytose *ex vivo*

Les tests de phagocytose *ex vivo* se déroulent comme décrit par Pearson et al. (2003). Dans une plaque 96 puits à fond plat contenant 150 µl de milieu de culture S2, les hémocytes de cinq larves L3 sont récupérés en déchirant délicatement la cuticule dorsalement et postérieurement.

$0,5-2.10^6$ bioparticules issues de bactéries à Gram négatif (*E. coli K12* fluorescein conjugated, 20 mg/ml, molecular probes) ou de bactéries à Gram positif (*S. aureus* fluorescein conjugated, 20 mg/ml, molecular probes) sont ajoutées. Après homogénéisation, la plaque est centrifugée trois minutes à 120 g, afin de déposer les particules sur les hémocytes. Les cellules sont incubées 7 minutes à 27°C, puis la phagocytose est arrêtée par rinçage rapide des cellules au PBS et par fixation de trois minutes dans du tampon PBS-glutaraldéhyde 4%. La fluorescence libre correspondant aux particules non phagocytées est arrêtée par remplacement du milieu par 60 µl d'une solution de bleu de trypan 0,04% (Sigma) dans un tampon à pH acide (20 mM sodium phosphate, 150 mM sodium chloride, 1,5 mM potassium

chloride, 0.04% trypan blue, pH=5,6). Les cellules sont ensuite observées au microscope inversé à fluorescence DMIRE2 (Leica). Pour les photographies, le protocole est adapté pour des boîtes Labtek 8 puits (Chamber slides, Nunc) pour un volume final de 200 µl afin d'avoir une meilleure résolution de l'image, les photographies sont prises avec une caméra numérique (LEICA, DC350F) à l'aide du logiciel d'acquisition Qfluoro.

Un contrôle a été effectué en bloquant la phagocytose avec de la cytochalasine D qui inhibe la dynamique du cytosquelette d'actine. Les hémocytes sont incubés en présence des particules et de cytochalasine D (5 µg/ml final). Après centrifugation (voir précédemment), les cellules sont incubées 10 minutes à 4°C puis 10 minutes supplémentaires à 27°C. La suite de l'expérience se déroule comme précédemment.

Le taux d'inhibition de la phagocytose est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = 100 - (\text{niveau de phagocytose moyen des hémocytes exprimant ExoSGAP}) / (\text{niveau de phagocytose moyen des hémocytes contrôles})$$

3. Marquage des hémocytes larvaires

Les hémocytes de larves au stade L3 tardif sont récupérés en déchirant la cuticule au niveau dorsal et l'hémolymphe est déposée sur une lamelle de verre puis séchée rapidement ou déposée dans une boîte labtek 8 puits (Chamber slides, Nunc) en présence de PBS, dans laquelle nous laissons déposer les cellules pendant trois minutes. Les cellules sont rincées deux fois au PBS (3 minutes) et sont ensuite fixées dans une solution de PBS-glutaraldéhyde 4% pendant trois minutes. Elles sont ensuite rincées deux fois 3 minutes dans du PBS. Le noyau est marqué en incubant les hémocytes trois minutes dans une solution de Hoechst (1/1000^{ème})/PBS. Après deux rinçages dans du PBS, les cellules sanguines sont perméabilisées 5 minutes avec du Triton X-100 0,1%, puis elles sont de nouveau rincées avant le marquage du cytosquelette. Le cytosquelette d'actine est marqué avec de la phalloïdine-FITC (5 µg/µl) pendant 15 minutes. Après rinçages, les lames ou lamelles sont montées dans du glycérol 80%. Les cellules sont observées au microscope à fluorescence (Leica MZ FLIII) et photographiées avec une caméra numérique (LEICA, DC300F). Les cellules à cristaux sont visualisées directement dans la larve : les larves sont incubées 10 minutes au bain-marie à 70°C ce qui induit la mélanisation dans ces cellules (Lanot et al., 2001; Zettervall et al., 2004).

VI. Culture de cellules S2

Les cellules Schneider S2 de *Drosophila melanogaster* sont une lignée cellulaire établie à partir d'embryons en phase tardive (Schneider, 1972). Ce sont des cellules de type hémocytes capables de phagocytose et semi-adhérentes. Leur temps de doublement est d'environ 24 heures avec une densité maximum d'environ 10^7 cellules/ml. Elles sont cultivées à 25°C dans du milieu DSM (Drosophila Schneider Medium, Gibco) contenant 10% de SVF décomplémenté (Sérum de Veau Fœtal, Gibco). Elles sont diluées au $1/10^{\text{ème}}$ tous les 3 à 4 jours pour maintenance, avec un maximum de dix transferts successifs.

1. ARN interférence (RNAi) en cellules S2

Les dsRNA (double strand RNA) sont produits selon le protocole fournit par le DRSC (<http://flyrnai.org>) (Clemens et al., 2000).

a. Préparation du double brin ARN (dsRNA) par transcription *in vitro*

Les amorces de PCR ont été commandées auprès de Sigma Genosys (Tab. M.2).

Amorces	Sens	Séquence 5'-xxx-3'
Rac2 5'UTR	sens	taatacgactcactatagg_GCCACAGAAAATCAGCAAATCC
Rac2 5'UTR	anti-sens	taatacgactcactatagg TGGTTTTCTTTGTGGCAGCTT
GFP-L	sens	taatacgactcactataggCAGACCACGTATAGTTCATCCATGCCATGTG
GFP-R	anti-sens	taatacgactcactatagg AGACCACGGAGAAGAAGACTTTTCACTGGAGTTTG

Tableau M. 2 : Oligonucléotides utilisés pour la PCR. (en minuscule : séquence du promoteur T7).

Les fragments PCR Rac2 5'UTR (496 pb) et GFP (700 pb) sont amplifiés en utilisant les amorces décrites dans le tableau M.2 grâce à la polymérase Taq Titanium (Clontech), suivant le protocole du fournisseur à partir du cDNA de Rac2 cloné dans pOT2 et de la GFP cloné dans le vecteur pTopo.

Les produits de PCR obtenus sont purifiés grâce au kit QIAquick PCR Purification (Qiagen). La synthèse des dsRNA à partir de ces produits est réalisée avec kit MEGAscript RNAi (Ambion) selon le protocole du fournisseur.

b. Transfection en plaque six puits (Falcon)

Les cellules sontensemencées à une concentration de 10^6 cellules/ml dans du milieu DMS sans sérum, à raison de 1 ml par puits. 15 µg de dsRNA Rac2-5'UTR ou GFP (témoin

négatif) sont ajoutés par puits. L'ensemble est incubé sous agitation à température ambiante pendant 30 minutes. 3 ml de milieu DMS-SVF 15% sont ensuite ajoutés. Les cellules, avant d'être utilisées pour les tests, sont incubées 3 à 4 jours à 25°C pour s'assurer de la dégradation des ARNs et de l'absence de protéine Rac2.

L'effet du RNAi sur l'expression de *Rac2* a été confirmé par Northern blot.

2. Test de l'activité de la NADPH-oxydase

La veille ou l'avant veille des tests, les cellules S2 sont réensemencées afin d'obtenir des cellules à une concentration de 4.10^6 - 8.10^6 cellules /ml en phase exponentielle de croissance.

a. Test de la réduction du cytochrome c : activité membranaire de l'enzyme

Dans cette technique, la production d'ions superoxyde est mesurée de manière indirecte. Les ions superoxyde produits notamment par la NADPH-oxydase sont capables de réduire certaines molécules comme, dans ce test, le cytochrome c oxydé. La cinétique de réduction du cytochrome C dépend donc de la cinétique de production des ions superoxydes. Elle est suivie en mesurant l'absorbance à 550 nm.

Les cellules S2 en phase exponentielle de croissance sont rincées deux fois dans du PBS (centrifugation 1000 rpm, 5 minutes), puis ramenées à une concentration de 4.10^7 cellules/ml dans du milieu de Schneider sans sérum. 50 μ L de cellules maintenues à 4°C, sont ajoutés à 1 ml de PBS⁺⁺ (0,5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ et 30 mM glucose) contenant 200 μ M de cytochrome c dans des cuves à spectrophotomètre. Le niveau de base de la réduction du cytochrome c est mesuré pendant quelques minutes par lecture en continu de l'absorbance à 550 nm. Les cellules sont stimulées par ajout de Phorbol Myristate Acétate ou PMA (1 à 5 μ g/ml final) qui est connu comme étant un activateur de la production d'O₂⁻ par les neutrophiles, ou avec 20-40 μ g de particules *E. coli* 12 (*E. coli* K12 fluorescein conjugated, 20mg/ml, molecular probe). Au cours du test le milieu réactionnel est à température constante, soit 25°C.

Afin d'éliminer le niveau de base qui pourrait être lié à la présence de débris cellulaires et notamment aux débris mitochondriaux, de l'azide de sodium peut être rajouté au milieu réactionnel avant les activateurs à une concentration de 0,2 mM à 1 mM. L'azide de Sodium est inhibiteur de la cytochrome oxydase du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale qui peut produire des ions superoxydes.

b. Test de la réduction du NBT

Lorsque le NBT (NitroBleu de Tétrazolium) (Sigma-Aldrich) est mis en présence d'un agent réducteur (c'est à dire d'une molécule dont le potentiel redox est plus négatif) il peut jouer le rôle d'accepteur d'hydrogène et/ou d'électrons et être alors réduit en un pigment bleu foncé insoluble : le formazan.

Dans des plaques Labtek 8 puits (Chamber slides, Nunc), les cellules en phase exponentielle de croissance sontensemencées à 8.10^4 dans 200 μ l de milieu DMS sans sérum en présence de 40 mM de glucose. Le NBT est ensuite ajouté à une concentration finale de 100 μ M. La production d'ions superoxyde permet la réduction du NBT qui précipite sous la forme de formazan (grains bleu-noir). Au cours du temps, une coloration bleue apparaît au niveau des cellules. L'apparition de cette coloration est suivie au cours du temps. Les cellules sont incubées en présence 20 à 80 μ g de *E. coli* (*E. coli* K12 fluroescetin conjugated, 20 mg/ml, molecular probe). L'expérience s'effectue à 25°C. Pour les photographies, les cellules sont préalablement lavées deux fois dans du PBS et fixées au PBS-glutaraldéhyde (voir marquage des cellules pour les conditions).

PARTIE III

RESULTATS

RESULTATS

CHAPITRE 1

EFFET D'EXOSGAP SUR LES RHO GTPASES

ET SUR LA REPONSE IMMUNITAIRE DE

LA DROSOPHILE

I. Introduction

Au laboratoire, la drosophile sert notamment de modèle pour l'étude des facteurs de virulence de *P. aeruginosa* (Fauvarque et al., 2002). Cette bactérie possède de nombreux mécanismes de virulence qui favorisent son développement dans son hôte en perturbant la réponse immunitaire et qui sont utilisés pour infecter des organismes différents (Jander et al., 2000; Rahme et al., 2000). Elle a notamment le système de sécrétion de type III qui lui permet d'injecter directement des toxines ou exoenzymes dans le cytoplasme de la cellule eucaryote cible. Les connaissances actuelles sur les fonctions cellulaires de ces exotoxines dont ExoS ont été essentiellement obtenues sur des modèles de cellules en culture ou *in vitro*.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'étude d'une de ces toxines, l'exoenzyme S de *P. aeruginosa*. La protéine FAS des mammifères (Factor Activating Exoenzyme S) est nécessaire à l'activité ADP-ribosyl transférase d'ExoS (Fu et al., 1993). Il existe chez la drosophile des protéines de la famille des 14-3-3 (14-3-3ε, 14-3-3ζ) présentant une forte homologie avec la protéine FAS. Ceci suggère que le génome de la drosophile possède les éléments nécessaires à l'activité des toxines de *P. aeruginosa*.

L'exoenzyme S est une protéine bifonctionnelle avec un domaine ADP-ribosyl-transférase ciblant plus particulièrement les GTPases monomériques de la famille Ras et un domaine GAP. ExoSGAP inhibe les GTPases monomériques de la famille Rho (Goehring et al., 1999; Krall et al., 2002). Dans les cellules en culture, il induit un réarrangement du cytosquelette d'actine et inhibe la phagocytose par des cellules d'une lignée de macrophages murins (Goehring et al., 1999; Krall et al., 2002; Rocha et al., 2003). Nous avons choisi d'étudier une toxine de fonction connue, plus particulièrement le domaine GAP d'ExoS, afin de valider une nouvelle approche expérimentale d'étude des toxines de type III au sein d'un organisme entier, la drosophile. Cette approche consiste en la construction de lignées transgéniques de drosophiles contenant la séquence codante d'une toxine bactérienne de type III, sous le contrôle des séquences UAS activatrices de la transcription (Upstream Activating Sequence) qui sont reconnues par le facteur de transcription Gal4 de levure. Ce système d'expression inductible dans les différents tissus de la drosophile permet d'étudier les effets d'ExoSGAP en l'exprimant dans différents types cellulaires ou organes.

II. Démarche expérimentale pour l'étude d'ExoSGAP par transgénèse chez la drosophile

Lignée inductrice
tissu spécifique

➤ organes non vitaux

• GMR-Gal4 : œil (*Glass Multimer Reporter*)

• en-Gal4 et MS1096 : aile (*engrailed*)

➤ Organes de la réponse immunitaire

• yolk-Gal4 : corps gras

• srp-Gal4 et crq-Gal4 : hémocytes (*serpent* et *croquemort*)

➤ Expression ubiquiste

• HS-gal4 (inductible par choc thermique) (*heat shock*)

• da-Gal4 (*daughterless*)

Lignée cible

P[UAS-ExoSGAP]

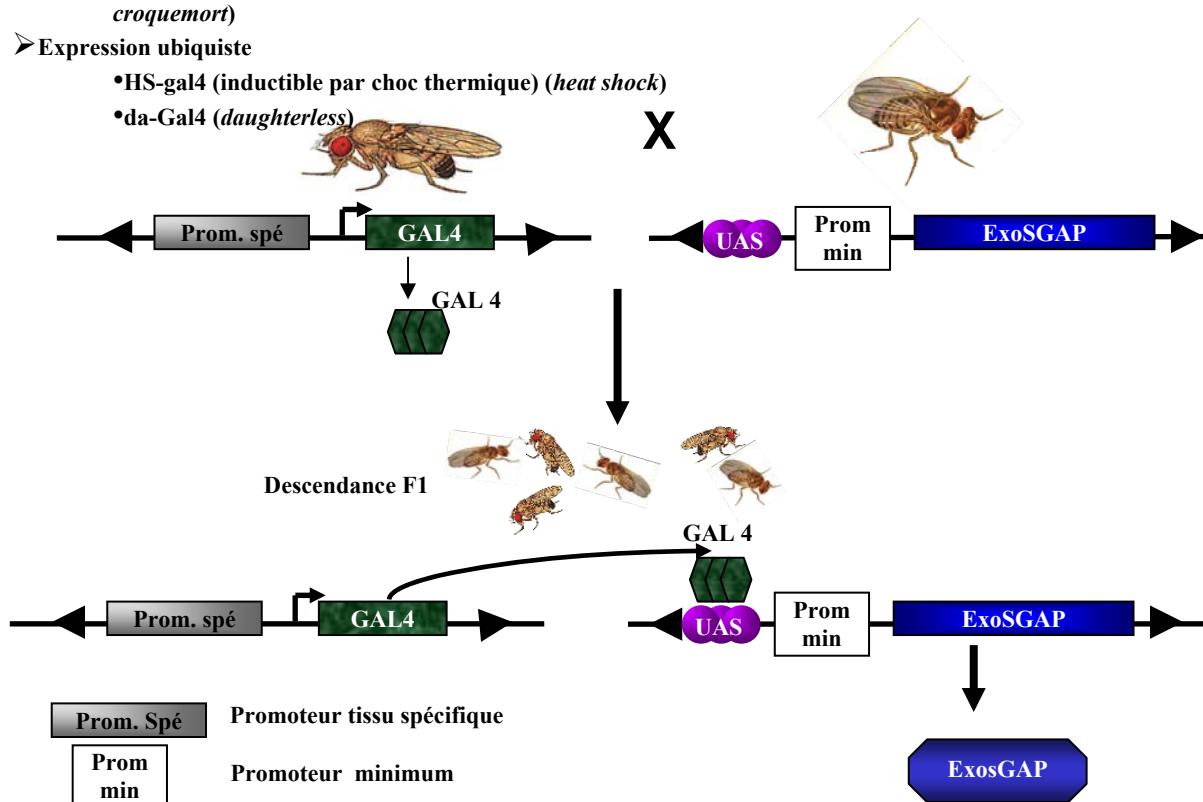


Figure I. 1 : Le système d'expression inducible et ectopique UAS-Gal4 chez la drosophile (Brand et Perrimon, 1993)

La lignée inductrice possède un élément transposable P permettant l'expression de l'activateur de transcription de levure Gal4 sous le contrôle d'un promoteur endogène spécifique d'un organe. La lignée cible contient elle aussi un élément transposable P, où le gène d'intérêt, dans ce cas ExoSGAP, a été cloné en aval d'un promoteur minimum et des séquences régulatrices de la transcription chez la levure UAS (Upstream Activating Sequence). Le croisement de la lignée inductrice et de la lignée cible permet l'expression du transgène dans la descendance dans un organe spécifié par le promoteur en amont de Gal4. Il existe de nombreuses lignées inductrices P[Gal4], seules celles utilisées au cours de cette étude sont indiquées.

Evelyne Bergeret et Marie-Odile Fauvarque ont amplifié par PCR le domaine GAP d'ExoS qui a été cloné dans le vecteur pP[UAS]. ExoSGAP se retrouve ainsi en aval des séquences UAS de levure. Une dizaine de lignées transgéniques indépendantes, dans

lesquelles l'élément transposable P[UAS-ExoSGAP] s'est intégré au génome de la drosophile (sur les chromosomes II et III), ont été obtenues. L'utilisation du système inductible UAS-Gal4 pour exprimer une toxine bactérienne (Fig. I.1) permet l'expression ectopique d'une protéine (Brand et al., 1994; Brand et Perrimon, 1993).

Nous avons tout d'abord montré qu'ExoSGAP était bien exprimé dans les lignées transgéniques : La transcription d'ExoSGAP est bien activée par le facteur Gal4 chez des drosophiles UAS-ExoSGAP/+ ; da-Gal4, d'après des mesures par RT-PCR (non montré).

III. Résultats

1. ExoSGAP cible les Rho GTPases *in vivo*.

a. L'expression dirigée d'ExoSGAP perturbe la morphogenèse de l'aile ou de l'œil

La toxine a été exprimée dans des organes non vitaux pour la mouche afin de voir si l'expression d'ExoSGAP induisait un phénotype visible et de confirmer ainsi que la protéine est bien active au sein des cellules de la drosophile.

L'expression d'ExoSGAP dans l'œil avec GMR-Gal4 ou dans l'aile avec en-Gal4 ou MS1096 induit un défaut de morphogenèse de ces deux organes, plus ou moins fort selon les lignées UAS-ExoSGAP utilisées (Fig. I.2 et I.3). Cette différence d'intensité de phénotype est probablement liée au niveau d'expression de la toxine qui dépend du site d'insertion du transgène dans le génome. L'expression dans l'œil à 25°C induit des défauts d'organisation des ommatidies, les soies inter-ommatidiales peuvent être absentes ou désorientées (Fig. I.2 C, D) par comparaison avec un œil normal où les 800 ommatidies sont parfaitement organisées (Fig. I.2 : A, B). Afin d'augmenter ce phénotype, nous avons construit des lignées, par recombinaison méiotique, possédant à la fois l'inducteur et deux copies du transgène. L'expression de deux copies d'ExoSGAP (Fig. I.2 E, F) augmente le phénotype associé à ExoSGAP : les ommatidies sont affaissées et les soies inter-ommatidiales sont absentes ou désorganisées.

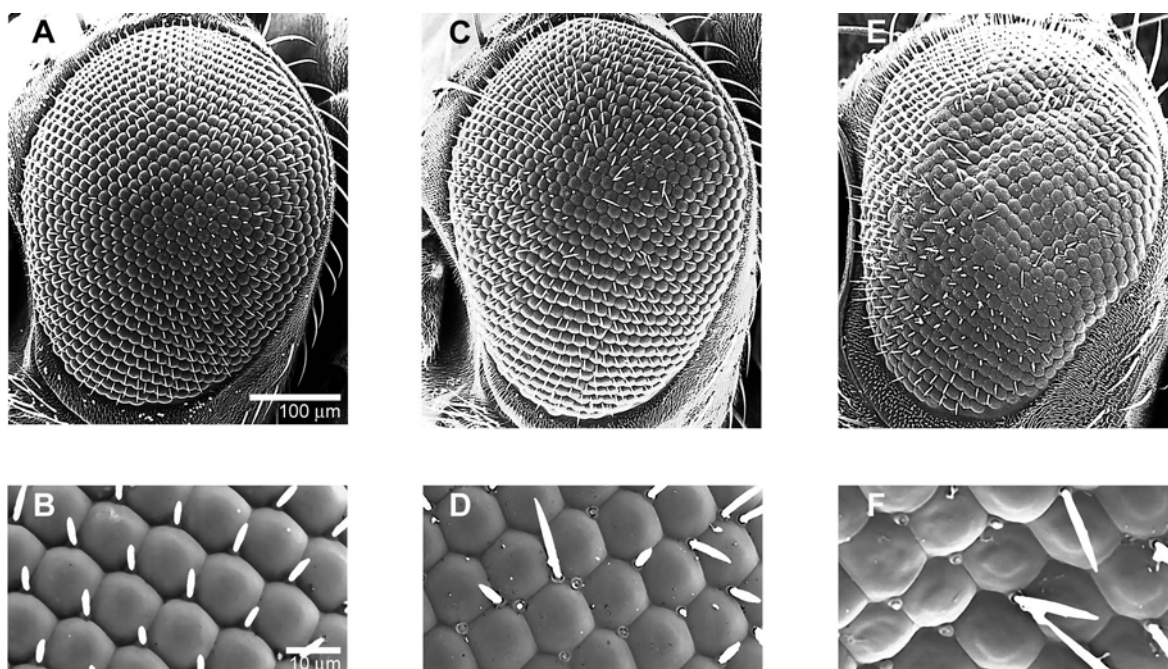


Figure I. 2 : Effet de l'expression d'ExoSGAP sur la morphogénèse de l'œil à 25°C

A, C, E : vue d'œil au microscope électronique à balayage, B, D, F : détail de l'œil. Effet d'ExoSGAP dans l'œil, côté antérieur à gauche.

A, B : contrôle GMR-Gal4/+, les ommatidies présentent une organisation régulière avec des soies inter-ommatidiales parfaitement orientées et régulières.

C, D : œil GMR-Gal4/UAS-ExoSGAP (1copie). ExoSGAP affecte la structure de l'œil, les soies sont désorientées ou absentes.

E, F : œil GMR-Gal4, UAS-ExoSGAP (2 copies). Le phénotype est plus prononcé : les ommatidies sont affaissées, les soies sont désorganisées et souvent absentes.

L'expression dirigée dans l'aile avec MS1096 est à l'origine de l'apparition de veines surnuméraires (Fig. I.3 B par comparaison avec A) ; ce phénotype est augmenté lorsque deux copies d'ExoSGAP sont présentes (MS1096/+ ;UAS-ExoSGAP/UAS-ExoSGAP) (Fig. I.3 C). Un phénotype de veines surnuméraires dans la partie postérieure de l'aile, entre la quatrième et la cinquième veine, est observé si Gal4 est sous le contrôle du promoteur d'aile *engrailed* (*en-Gal4*) (Fig. I.3 F, G par comparaison avec D, E). Les phénotypes induits par ExoSGAP sont légèrement plus forts à 25°C qu'à température ambiante (21°C) (résultats non montrés).

La morphogénèse de l'aile et de l'œil chez la drosophile est un processus qui dépend d'une régulation fine de voies de signalisation par les Rho GTPases. Le phénotype associé à ExoSGAP est donc probablement dû à son activité de catalyseur de l'hydrolyse du GTP par les Rho GTPases.

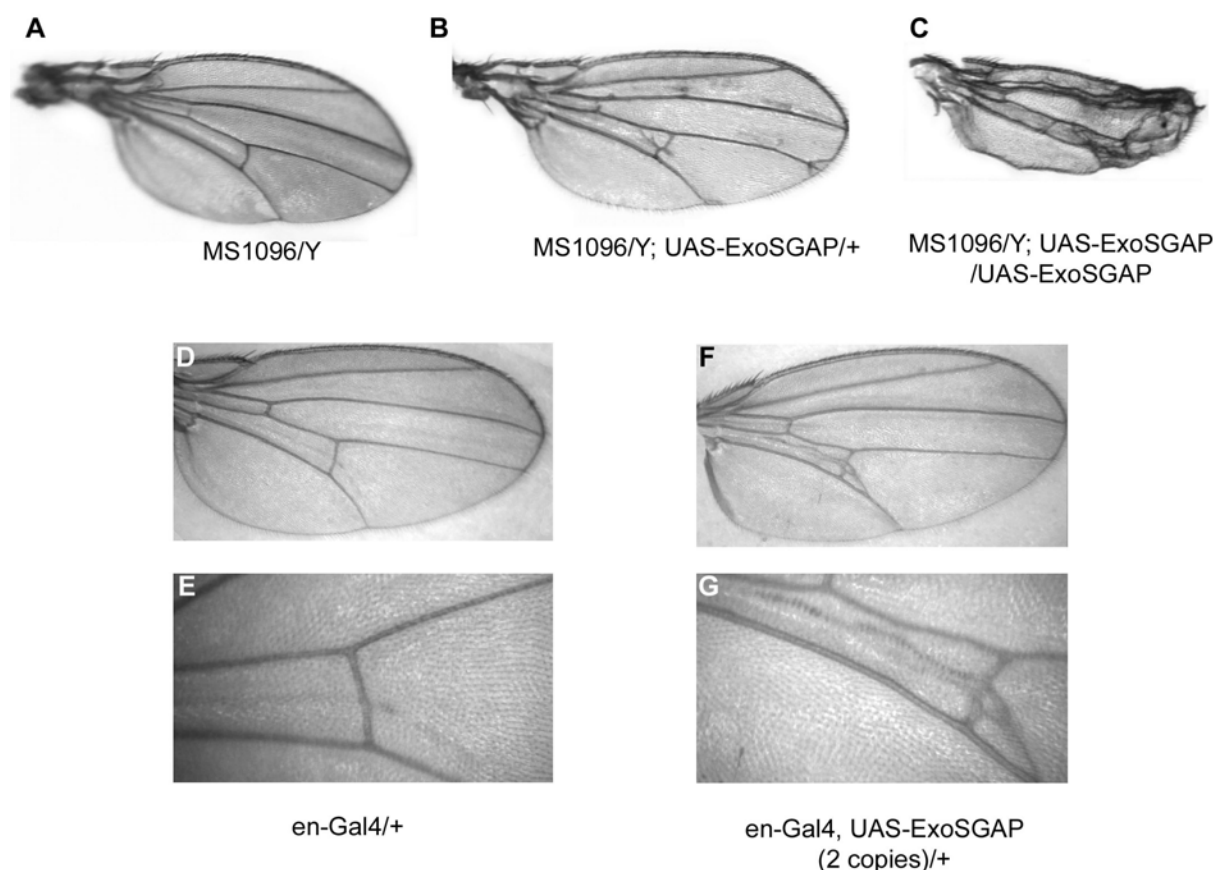


Figure I. 3 : Effet de l'expression d'ExoSGAP sur la morphogénèse de l'aile à 25°C

Côté proximal à gauche, côté antérieur en haut.

A-C : expression d'ExoSGAP dans l'aile à l'aide de l'inducteur MS1096, microscope Nikon, grossissement x2.

A : aile contrôle MS1096/Y, l'aile présente une structure régulière, avec MS1096 la cross-veine antérieure est souvent tronquée ou absente.

B : aile MS1096/Y ;UAS-ExoSGAP/+, des veines surnuméraires apparaissent.

C : aile exprimant deux copies d'ExoSGAP (MS1096/Y ;UAS-ExoSGAP/UAS-ExoSGAP). L'aile apparaît très déformée et réduite. Photographies prises avec une caméra 3CCD color video (Sony).

D-H : Expression d'ExoSGAP dans l'aile à l'aide de l'inducteur en-Gal4, loupe binoculaire grossissement x4 (D-F), ou x10 (E-G) pour le détail.

D, E : aile contrôle en-Gal4/+, l'aile présente une structure régulière, avec en-Gal4, il existe parfois une courte veine surnuméraire à partir de la cross-veine postérieure.

L-M : Expression de 2 copies d'ExoSGAP (en-Gal, UAS-ExoSGAP (2 copies). Des veines surnuméraires apparaissent dans la partie postérieure de l'aile entre les quatrième et cinquième veines.

Photographies prises à la loupe binoculaire Leica MZ FLIII en utilisant une caméra numérique Leica et le logiciel d'acquisition IM50.

Remarque : dans la suite de l'étude, la lignée inductrice en-Gal4 est préférée à MS1096 bien que le phénotype associé à ExoSGAP soit plus faible. En effet, la lignée MS1096 présente un phénotype très pénétrant d'une disparition partielle à complète de la cross-veine antérieure. La lignée en-Gal4 a parfois une courte veine supplémentaire au niveau de la cross-veine postérieure, l'intensité et la pénétrance de ce phénotype sont plus faibles que celui de MS1096 : la majorité des individus en-Gal4/+ ne présentent aucun défaut de structure de l'aile.

b. ExoSGAP inhibe l'activité des Rho GTPases Rac1, Rho1 et Cdc42 in vivo

Afin de tester, l'activité d'ExoSGAP sur les Rho GTPases, nous avons construit des lignées recombinantes qui vont permettre la coexpression d'ExoSGAP et des différentes Rho GTPases, afin d'observer l'effet d'ExoSGAP sur les phénotypes induits par la surexpression de Rac1, Rac2, Rho1 et Cdc42.

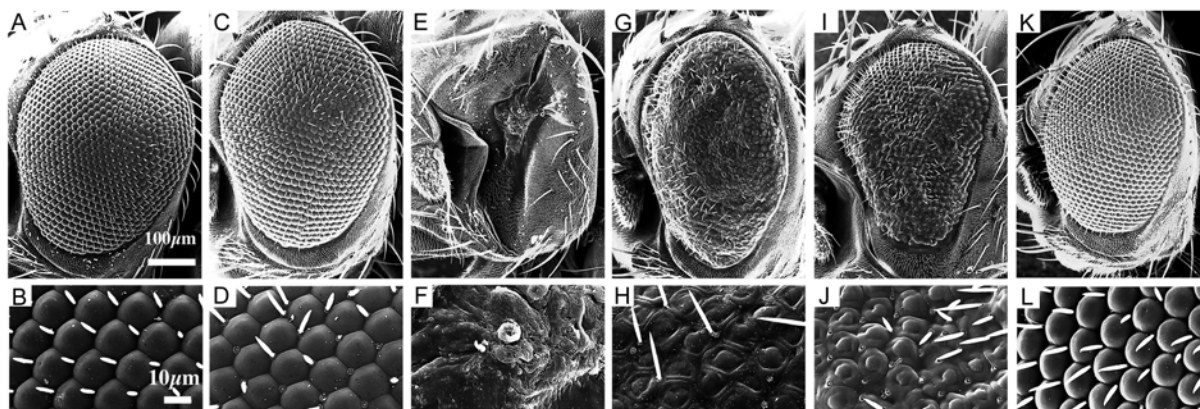


Figure I. 4 : ExosGAP inhibe l'activité des Rho GTPases dans l'œil de la drosophile

A, C, E, G, I, K : microscopie à balayage d'œil de mouches. B, D, F, H, J, L : détail des ommatidies.

A-B : œil contrôle GMR-Gal4/+ l'œil présente une structure régulière de 800 ommatidies. C-D : œil exprimant une copie d'ExoSGAP (GMR-Gal4/ UAS-ExoSGAP), il apparaît légèrement rugueux avec une perte, une duplication ou une mauvaise orientation des soies inter-ommatidiales.

E-F : mouche survivante surexprimant Rac1, GMR-Gal4/UAS-Rac1, l'œil est quasiment absent et ne présente aucune structure ordonnée. G-H : coexpression d'ExoSGAP et Rac1 GMR-Gal4/UAS-Rac1,UAS-ExoSGAP, l'œil apparaît beaucoup mieux formé et nettement mieux organisé.

I-J : expression dirigée de Rho1 dans l'œil, GMR-Rho1/+. L'œil apparaît très rugueux, les ommatidies sont fusionnées et les soies désorganisées. K-L : coexpression de Rho1 et ExoSGAP dans l'œil : GMR-Gal4, UAS-ExoSGAP/+ ; GMR-Rho1/+, l'œil est redevenu complètement sauvage.

La surexpression seule de Rac1 est létale à 90%, cette létalité est due à une faible fuite du promoteur GMR dans d'autres tissus que l'œil. Les individus survivants ont des yeux quasiment absents et totalement désorganisés (Fig. I.4 E-F). La coexpression d'ExoSGAP et Rac1 permet de corriger ce phénotype (Fig. I.4 G-H) : l'œil est nettement mieux structuré même si les ommatidies sont fusionnées et les soies désorientées. Cette coexpression permet aussi une meilleure viabilité des mouches avec environ 10 % de mortalité résiduelle. La surexpression de Rac1 dans l'aile avec en-Gal4 est létale, la coexpression avec ExoSGAP sauve très partiellement de cette létalité ; les individus survivants ont des ailes très réduites et déformées (résultats non montrés).

La surexpression de Rho1 dans l'œil induit des défauts de morphogénèse, l'œil apparaît rugueux avec des ommatidies fusionnées et des soies désorganisées (Fig. I.4 I-J).

Ce phénotype est complètement corrigé en coexpression avec ExoSGAP (Fig. I.4 K-L). Des résultats similaires ont été obtenus avec GMR-cdc42, le phénotype induit par la surexpression de cdc42 est cependant plus faible au départ (résultats non montrés).

Nous avons aussi observé l'effet d'une perte de dose génique des différentes Rho GTPases sur le phénotype d'ExoSGAP. La perte d'une seule dose génique d'une des Rho GTPases n'a pas d'effet sur le phénotype d'ExoSGAP dans l'œil.

Finalement, nous avons coexprimé dans l'œil ExoSGAP et une GTPase de la famille Ras, Ras85D. La surexpression de Ras85D seule n'a pas d'effet sur la morphogenèse et on ne voit aucun effet sur le phénotype lié à ExoSGAP. Nous ne pouvons donc pas conclure si Ras est une cible indirecte du domaine GAP de la toxine ExoS.

Ces résultats montrent qu'ExoSGAP agit bien *in vivo* comme un régulateur négatif de l'activité des Rho GTPases Rac1, Rho1 et Cdc42. Pour la première fois dans un organisme entier, le rôle de régulateur négatif d'ExoS sur l'activité des Rho GTPases a été observé.

c. ExoSGAP inhibe l'activité de la Rho GTPase Rac2 *in vivo*

Dans le cas de Rac2, il n'existait jusqu'à présent que des lignées transgéniques GMR-Rac2, où Rac2 est sous le contrôle du promoteur d'œil GMR. Ces lignées ne présentent aucun phénotype visible à l'état hétérozygote. La coexpression de GMR-Rac2 avec ExoSGAP permet de compenser complètement les effets liés à l'expression de la toxine dans l'œil (non montré). Ce résultat suggère une compensation de la perte de l'activité de Rac2 lié à ExoSGAP.

Pour induire plus fortement l'expression de Rac2, nous avons construit avec Jackie Perrin (Master I, 2004) des lignées transgéniques P[w⁺, UAS-Rac2] où le cDNA de Rac2 a été cloné en aval des séquences UAS. Plusieurs lignées transgéniques ont été ainsi obtenues avec des insertions des éléments P[w⁺, UAS-Rac2] sur chacun des chromosomes.

Dans un premier temps, la surexpression de UAS-Rac2 dans ces lignées a été confirmée par RT-PCR. Les lignées UAS-Rac2 ont été croisées avec les lignées inductrices HS-Gal4 ou da-Gal. Pour trois des quatre lignées UAS-Rac2 testées, la surexpression de Rac2 sous le contrôle de da-Gal4 est létale (lignées UAS-Rac2 II2.1/Y, UAS-Rac2 VI45.20/Cyo, UAS-Rac2 III4.13/TM3,sb, UAS Rac2 II 13.19/(TM3,sb)), seule la lignée viable (UAS-Rac2 III5.30/(Cyo)) a été utilisée pour la RT-PCR. Avec HS-Gal4, toutes les lignées sont viables, l'expression de Rac2 est induite en incubant des mouches une heure à 37°C, une

heure à 17°C , puis deux heures à 25°C avant l'extraction des ARNs. Pour chacune des lignées, *Rac2* est surexprimé par rapport au témoin Gal4/+ (résultats non montrés). Il existe une variabilité dans le niveau de surexpression entre les différentes lignées qui dépend probablement du site d'insertion du transposon dans le génome qui facilite plus ou moins son expression. La surexpression de *Rac2* (lignée UAS-*Rac2* III 5.30) est plus importante quand *Rac2* est induit par le choc thermique plutôt qu'avec da-Gal4, indiquant que l'inducteur HS-Gal4 permet une activation plus importante du transgène.

Nous avons ensuite testé l'effet de la surexpression de *Rac2* dans l'aile ou dans l'œil en coexpression ou non avec ExoSGAP, afin de voir si ExoSGAP était bien un régulateur négatif de l'activité de *Rac2*.

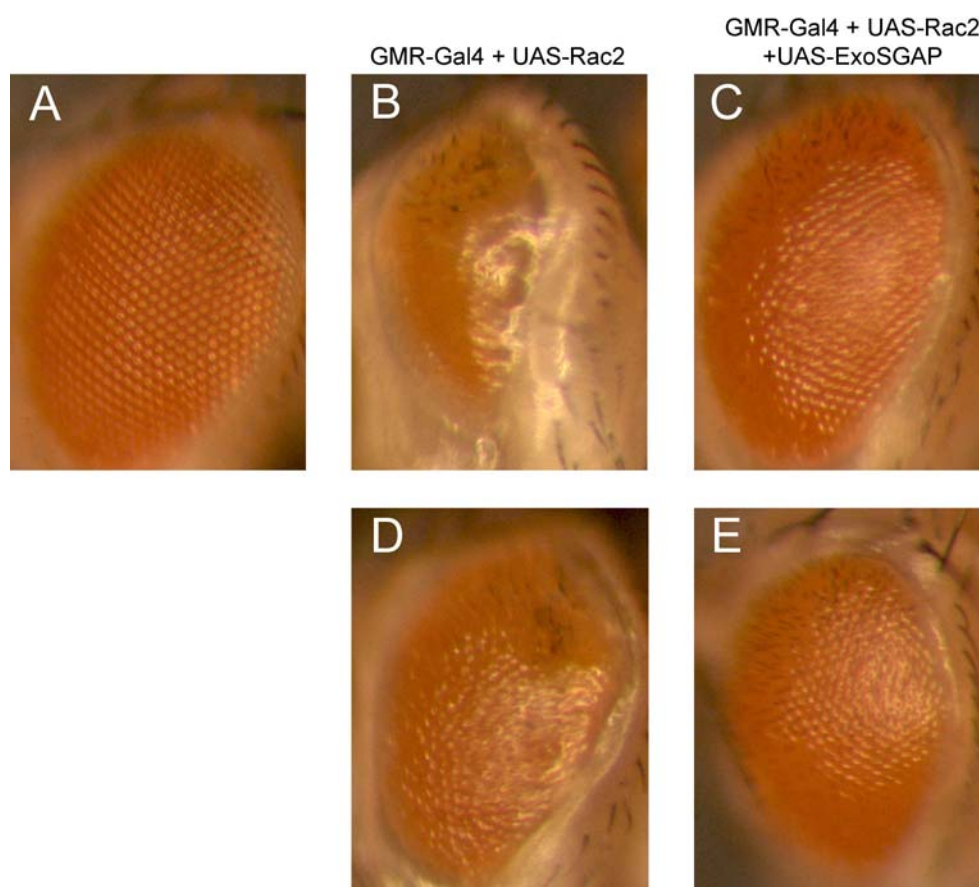


Figure I. 5 : ExoSGAP inhibe l'activité de *Rac2* dans l'œil de la drosophile

Photographies d'œil à la loupe binoculaire (grossissement x 4)

A : œil contrôle GMR-Gal4/+.

B : exemple d'une lignée présentant un phénotype fort, GMR-Gal4/UAS-*Rac2* VI 45.20, l'œil est très réduit, luisant et désorganisé.

C : coexpression d'ExoSGAP et *Rac2* dans l'œil (GMR-Gal4,UAS-ExoSGAP(2 copies)/UAS-*Rac2* VI 45.20 l'œil retourne vers un phénotype sauvage, mais le phénotype associé à ExoSGAP n'est pas supprimé.

D : exemple d'une lignée présentant un phénotype plus faible, GMR-Gal4/+ ; UAS*Rac2* III 4.13, l'œil est destructuré.

E. Coexpression d'ExoSGAP et *Rac2* dans l'œil (GMR-Gal4, UAS-ExoSGAP(2 copies)/UAS-*Rac2* III 4.13) l'œil est nettement mieux structuré, mais le phénotype associé à ExoSGAP n'est pas supprimé.

Dans l'œil, la surexpression de Rac2 peut conduire à une létalité quasi-totale où les adultes survivants présentent des yeux très réduits, luisants, rugueux et parfois tâchés de noir (Fig. I.5 B). Avec d'autres lignées UAS-Rac2, les phénotypes sont plus faibles : l'œil est légèrement réduit et rugueux. D'autres lignées ont des phénotypes intermédiaires (Fig. I.5 D).

Les phénotypes induits par la surexpression de Rac2 dans l'œil sont corrigés par l'expression d'ExoSGAP (Fig. I.5), ce qui confirme qu'ExoSGAP inhibe l'activité de Rac2. Néanmoins le phénotype d'ExoSGAP est toujours présent et cela quelle que soit la lignée UAS-Rac2 utilisée. Ce dernier point indique qu'ExoSGAP agit aussi probablement sur la signalisation en aval de Rac2.

Des résultats similaires sont observés lorsque Rac2 et ExoSGAP sont coexprimés dans l'aile. La surexpression de Rac2 induit des défauts de morphogenèse de l'aile plus ou moins forts qui sont compensés par l'expression d'ExoSGAP, néanmoins le phénotype associé à ExoSGAP demeure (Fig I.5 C, F et résultats non montrés).

2. ExoSGAP affecte la réponse immunitaire de l'hôte

Les GTPases monomériques sont nécessaires à la réponse immunitaire chez les mammifères, notamment pour le contrôle de la réponse cellulaire comme la migration cellulaire, la phagocytose et l'activation de la NADPH-oxydase. Les Rho GTPases contrôlent par exemple les réarrangements du cytosquelette d'actine pour la migration et la phagocytose, et elles sont impliquées dans la régulation des voies TLR (Bokoch, 2005). Nous avons voulu tester l'effet de l'expression d'ExoSGAP sur la résistance aux infections en exprimant la toxine dans les différents tissus participant à la réponse immunitaire chez la drosophile : le corps gras qui permet la réponse humorale en synthétisant des peptides antimicrobiens et les hémocytes qui sont responsables de la réponse cellulaire.

a. L'expression ubiquitaire d'ExoSGAP affecte la résistance des mouches aux infections par *P. aeruginosa* et *S. aureus*

Les mouches ont été infectées par piqûre septique avec deux souches de *P. aeruginosa*, l'isolat clinique CHA et le mutant CHA::*exsA*. Des expériences ont montré que la souche CHA sécrète ExoS et ExoT mais apparemment pas ExoY (Dr Ina Attrée, communication personnelle). Le mutant CHA::*exsA* (CHA-D1) n'est donc pas capable de

sécréter les différentes toxines de type III (Dacheux et al., 1999). Afin que le système de sécrétion de type III soit rapidement activable lors de l'infection par CHA, nous utilisons des cultures bactériennes en phase exponentielle de croissance. Comme il avait été observé au laboratoire, une infection par le mutant du système de sécrétion de type III, CHA::*exsA*, conduit à une mort plus lente des drosophiles qu'une infection par la souche d'origine CHA (Fig. I.6-7).

Les drosophiles UAS-ExoSGAP ont été croisées avec des lignées da-Gal4 ou HS-Gal4, afin d'avoir une expression ubiquiste de la toxine dans la descendance. L'expression du facteur Gal4 sous le contrôle d'un promoteur inductible par choc thermique (HS-Gal4) est obtenue en incubant les mouches adultes trente minutes à une heure à 37°C avant infection. La lignée HS-Gal4 permet de s'affranchir des effets qu'aurait pu avoir ExoSGAP au cours du développement. Les mouches exprimant ExoSGAP sous le contrôle de da-Gal4 ou HS-Gal4 sont parfaitement viables en absence d'infection et ne présentent aucun phénotype visible.

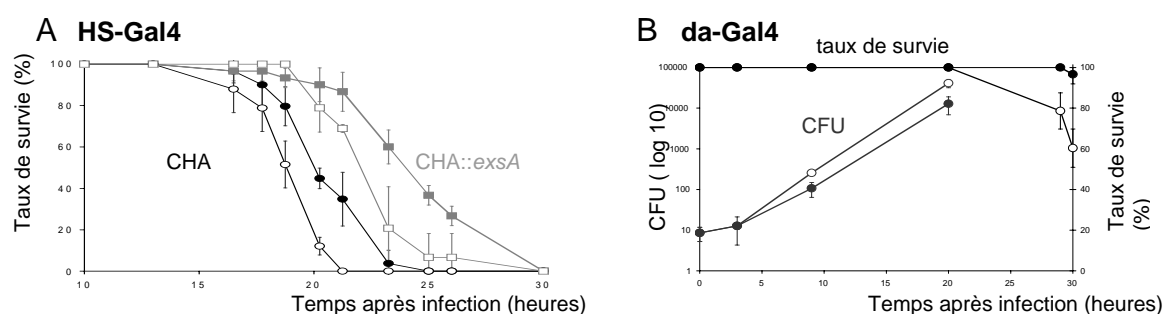


Figure I. 6 : L'expression ubiquitaire d'ExoSGAP affecte la résistance des mouches aux infections par *P. aeruginosa* (CHA et CHA::*exsA*).

A : survie des mouches âgées de 5 à 10 jours après infection par piqûre septique à l'aide d'une culture de trois heures en phase exponentielle de croissance des souches de *P. aeruginosa* CHA (ronds noirs) ou CHA::*exsA* (mutante pour le système de sécrétion de type III) (carrés gris). Avant infection, les cultures sont diluées à une DO_{600nm} de 0,4 pour avoir une multiplicité d'infection de 50-100 bactéries par mouche. Pour tests de survie les mouches sont placées par groupe de dix dans trois tubes distincts. L'expression ubiquiste d'ExoSGAP avec HS-Gal4 après choc thermique d'une heure à 37°C diminue la résistance aux infections aussi bien par CHA ($P < 0,01$) que CHA::*exsA* ($P < 0,03$) des mouches HS-Gal4/UAS-ExoSGAP (ronds et carrés vides) par rapport aux individus contrôles HS-Gal4/+ (ronds et carrés pleins).

B : courbe de croissance de *P. aeruginosa* (CHA) après infection par piqûre septique des mouches avec une culture diluée à DO_{600nm} de 0,1. Les bactéries se multiplient plus rapidement chez les mouches exprimant ExoSGAP de façon ubiquiste (UAS-ExoSGAP/+; da-Gal4/+) par rapport au contrôle da-Gal4/+. Dans ces expériences, les bactéries sont extraites de groupe de cinq mouches aux différents temps.

Les drosophiles exprimant ExoSGAP avec l'inducteur da-Gal4 ou avec HS-Gal4 sont plus sensibles aux infections par les deux souches de *P. aeruginosa* CHA et CHA::*exsA*

(Fig. I.6 A, C). L'expression d'ExoSGAP par les cellules de l'hôte ne permet pas de compenser complètement l'absence du système de sécrétion de type III, puisque des mouches exprimant ExoSGAP infectées par CHA::*exsA* meurent plus lentement que les témoins infectés par CHA. Les autres toxines de type III, c'est-à-dire ExoT et le domaine ADPRT d'ExoS, contribuent aussi à la virulence bactérienne.

Afin de déterminer, s'il existait un lien entre la sensibilité aux infections et le développement de *P.aeruginosa* au sein de l'organisme hôte, nous avons mesuré la croissance bactérienne au cours de l'infection. Pour avoir une cinétique de mortalité plus lente, nous avons dilué les cultures à une DO_{600nm} de 0,1 avant infection. A différents temps, trois groupes de cinq mouches ont été collectés pour chacun des génotypes testés. Les drosophiles sont ensuite broyées dans des tubes contenant du LB. Après une centrifugation lente, pour séparer les bactéries des débris, les surnageants sont dilués en série avant d'être étalés sur des boîtes de culture de *P. aeruginosa* (PIA), le lendemain la croissance bactérienne est évaluée en comptant le nombre de colonies de CHA formées (CFU : Colony Forming Unit) ramené à l'équivalence pour une mouche. Nous avons pu ainsi montrer que la sensibilité des individus exprimant ExoSGAP aux infections par CHA est corrélée à une croissance plus rapide des bactéries dans l'organisme (Fig. I.6 B). Dix-huit heures après infection, juste au moment où les premières mouches exprimant ExoSGAP commencent à mourir, la CFU est de 41200 +/- 9100 contre 12800 +/- 6000 pour les mouches contrôles. La différence de virulence observée entre la souche CHA et CHA::*exsA* semble aussi corrélée avec un retard de multiplication de la souche CHA::*exsA* par rapport à la souche CHA (résultats non montrés) (Fauvarque et al., 2002). Le système de type III permet aux bactéries de croître plus rapidement en perturbant les systèmes de défense de l'hôte. D'après nos résultats, le domaine GAP d'ExoS participe à la virulence bactérienne.

Ces premiers résultats montrent que l'expression d'ExoSGAP par les cellules de l'hôte augmente la virulence de *P. aeruginosa*. Cette expression compense partiellement un défaut dans le système de sécrétion de type III bactérien. Les mécanismes de défense de la drosophile sont perturbés par la toxine mais ne sont pas complètement abolis puisqu'une infection par une souche non pathogène de *E. coli* (DH5α) ne tue pas les drosophiles exprimant ExoSGAP (résultat non montré).

P. aeruginosa est une bactérie à Gram négatif, nous avons donc voulu savoir si l'expression ubiquiste d'ExoSGAP affectait aussi la résistance aux infections par des bactéries à Gram positif. Nous avons donc infecté les mouches par piqûre septique à partir d'un culot de *S. aureus* issu d'une culture en phase stationnaire de croissance. Là encore, les drosophiles exprimant ExoSGAP dans toutes leurs cellules sont significativement plus sensibles que les individus témoins (Fig. I.7). ExoSGAP ne semble donc pas agir sur des processus spécifiques d'un pathogène donné. La toxine affecte des mécanismes généraux de la réponse immunitaire.

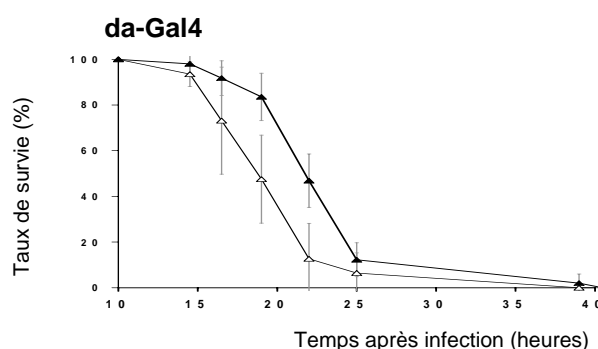


Figure I. 7 : L'expression ubiquitaire d'ExoSGAP affecte la résistance des mouches aux infections par *S. aureus*.

Survie après infection par piqûre septique à l'aide d'un culot d'une culture de *S. aureus*. Les mouches exprimant de façon ubiquiste ExoSGAP (UAS-ExoSGAP/+;da-Gal4/+) (triangle vide) sont plus sensibles aux infections par la bactérie par *S. aureus*, que les individus contrôles da-Gal4/+ (triangle plein) ($P < 0,01$).

b. ExoSGAP affecte spécifiquement la réponse immunitaire cellulaire mais pas la réponse humorale associée au corps gras.

L'expression d'ExoSGAP affecte la résistance des drosophiles aux infections. Nous avons ensuite recherché dans quels organes impliqués dans la réponse immunitaire pouvaient être la cible d'ExoSGAP. La toxine peut affecter le fonctionnement du corps gras, le siège de la réponse humorale et de l'expression NF- κ B dépendante des peptides antimicrobiens. La réponse cellulaire peut aussi être une cible d'ExoSGAP. Cette réponse permet l'activation de la cascade de la prophénol-oxydase, l'encapsulation de gros pathogènes chez la larve, ainsi que la phagocytose des pathogènes et la synthèse de peptides antimicrobiens.

ExoSGAP a été exprimé dans le corps gras par croisement avec la lignée *yolk-Gal4*. L'expression d'ExoSGAP par les cellules du corps gras n'affecte pas la résistance des

mouches aux infections par CHA et CHA::*exsA*. ExoSGAP ne semble donc pas avoir un effet majeur sur la fonction immunitaire du corps gras (Fig. I.8 A).

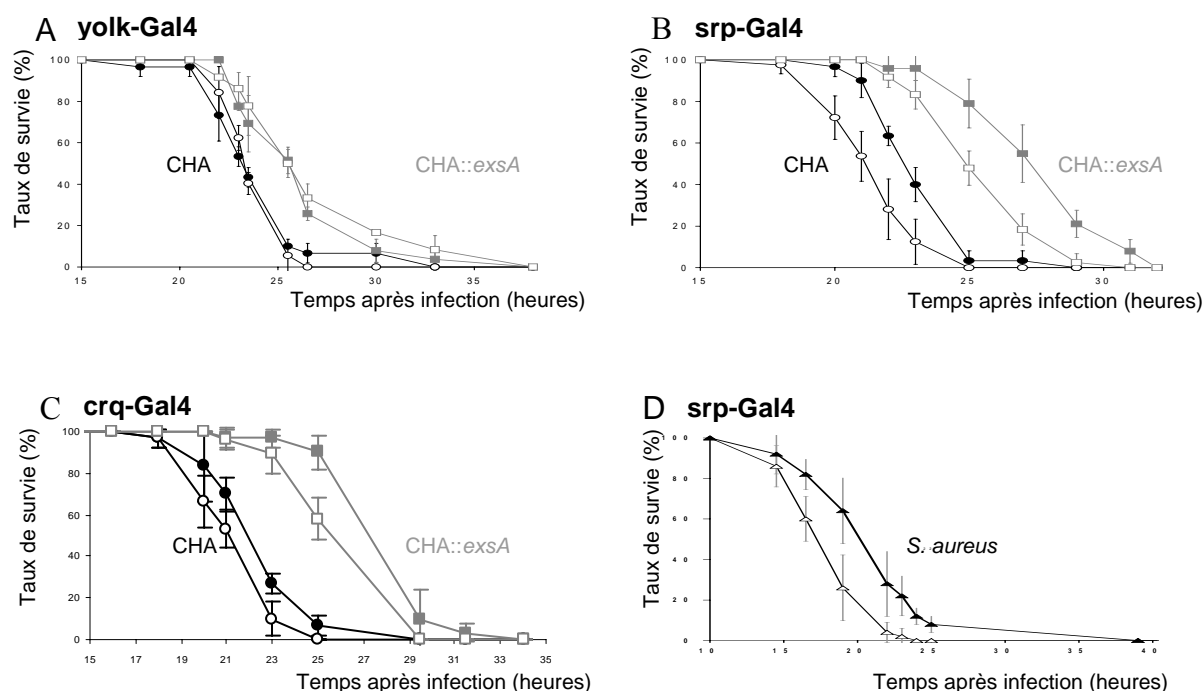


Figure I. 8 : L'expression dirigée d'ExoSGAP dans les hémocytes affecte la résistance des mouches aux infections par *P. aeruginosa* (CHA et CHA::*exsA*) et par *S. aureus*.

A-C survie aux infections après piqûre septique à l'aide d'une culture de trois heures de CHA (en noir) ou du mutant du système de sécrétion de type III CHA::*exsA* (en gris) diluée à une DO_{600nm} de 0,4. D : survie après infection par piqûre septique à l'aide d'un culot d'une culture de *S. aureus* (triangle noir). Pour les tests de survie, les mouches sont placées par groupe de dix dans trois tubes. Les mouches sont âgées de 5 à 10 jours.

Mouches contrôles formes pleines, mouches exprimant ExoSGAP forme vide.

A : l'expression d'ExoSGAP par les cellules du corps gras (yolk-Gal4/UAS-ExoSGAP) n'affecte pas la résistance des mouches aux infections par *P. aeruginosa*.

B : l'expression d'ExoSGAP dans les hémocytes (srp-Gal4/+ ;UAS-ExoSGAP/+) diminue la résistance aux infections par CHA ($P < 0,01$) où CHA::*exsA* ($P < 0,02$) des drosophiles par rapport aux individus témoins srp-Gal4/+. Des résultats similaires sont obtenus avec l'inducteur crq-Gal4, la sensibilité étant moins forte avec cet inducteur (C).

D : les mouches exprimant ExoSGAP dans les hémocytes sont plus sensibles aux infections par la bactérie à Gram positif *S. aureus* (triangle plein) ($P < 0,01$).

Parallèlement, ExoSGAP a été exprimé spécifiquement dans la lignée hémocytaire par croisement avec la lignée inductrice sous le contrôle *srp* (*serpent*, lignée srp-Gal4). Une infection des individus exprimant ExoSGAP dans les hémocytes conduit à une mort plus rapide lorsque les mouches sont infectées soit par les bactéries à Gram négatif CHA ou CHA::*exsA* (Fig. I.8 B) soit par la bactérie à Gram positif *S. aureus* (Fig. I.8 D). Dans la lignée srp-Gal4, le facteur Gal4 est aussi plus faiblement exprimé au niveau du corps gras et du vaisseau dorsal (Crozatier et al., 2004). Des résultats similaires ont été obtenus avec une

deuxième lignée inductrice spécifique des plasmacytes (*crq-Gal4*, *croquemort*) (J-M. Ubeda, M. Meister, communication personnelle) ce qui permet d'exclure un effet sur le corps gras et d'attribuer les résultats obtenus aux effets d'ExoSGAP dans les hémocytes (Fig. I.8 C). La différence de sensibilité est plus faible avec *crq-Gal4* par rapport à *srp-Gal4*, probablement en raison d'une plus faible expression du facteur Gal4 avec le promoteur *croquemort* par rapport à *serpent* (M. Meister, communication personnelle).

Nos résultats montrent qu'ExoSGAP affecte spécifiquement la réponse immunitaire cellulaire *in vivo* et n'a pas d'effet sur réponse dépendante du corps gras. La sensibilité observée est aussi en faveur d'un rôle important de la réponse immunitaire cellulaire dans les premières heures après infection. Les plasmacytes peuvent être très importants en début d'infection, la phagocytose est un mécanisme de défense immédiat qui ne nécessite pas la transcription de gènes. Les plasmacytes ont aussi un rôle d'activation de la réponse humorale qui pourrait être affectée par ExoSGAP (non testé) (Basset et al., 2000; Foley et O'Farrell, 2003).

c. Les drosophiles exprimant ExoSGAP sont plus sensibles aux infections par ingestion

Lors d'une infection par ingestion, les épithélia sont les premiers tissus à être en contact avec le pathogène, ils correspondent à la première ligne de défense. L'épithélium intestinal est aussi capable de synthétiser des peptides antimicrobiens et de produire du NO (oxyde nitrique) après infection (Foley et O'Farrell, 2003). Le NO sert de messenger secondaire probablement en direction des hémocytes. Les cellules sanguines participent ensuite à l'activation de la réponse NF- κ B dépendante du corps gras. En effet, les larves mutantes *domino* qui ne développent pas d'hémocytes présentent un défaut d'expression de la diptéricine après infection par *Erwinia carotovora* (Basset et al., 2000; Foley et O'Farrell, 2003).

Nous avons testé si ExoSGAP agit sur ces mécanismes en infectant des mouches adultes infectées par voie naturelle.

L'expression d'ExoSGAP soit de manière ubiquiste avec *da-Gal4*, soit dans les hémocytes avec *srp-Gal4* ou *crq-Gal4*, provoque une sensibilité accrue aux infections par rapport aux individus contrôles (Fig. I.9 A et B respectivement, non montré pour *crq-Gal4*). Nous avons observé en parallèle que l'expression d'ExoSGAP dans le corps gras grâce à

l'inducteur *yolk-Gal4* n'affecte pas la résistance des mouches aux infections par ingestion (résultat non montré).

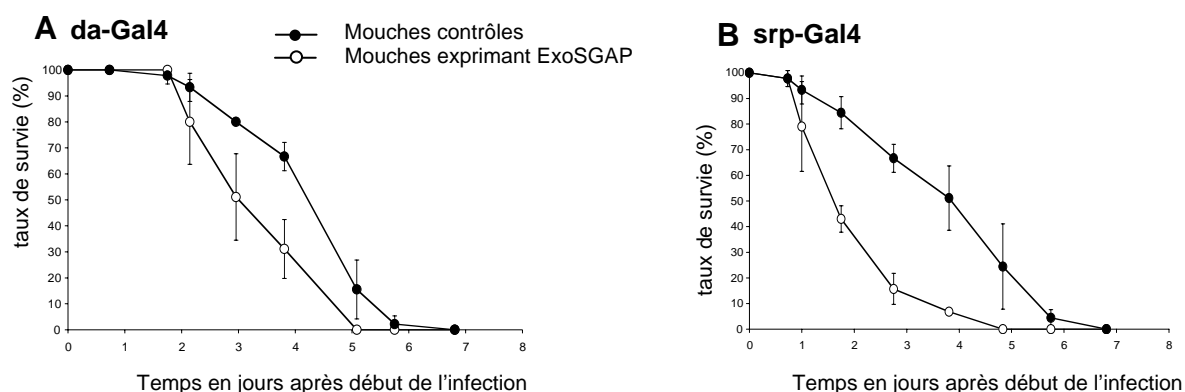


Figure I. 9 : L'expression d'ExoSGAP diminue la résistance des mouches aux infections par ingestion.

45 individus de même sexe sont placés par groupes de 15 dans des tubes contenant du papier absorbant imbibé d'une culture de CHA en phase exponentielle de croissance diluée à une DO_{600nm} de 0,2 dans une solution de sucrose 5% stérile.

A : les mouches exprimant de façon ubiquiste ExoSGAP (*UAS-ExoSGAP/+;da-Gal4/+* (cercle)) sont plus sensibles à CHA que les mouches contrôles *da-Gal4/+* (rond noir) ($P < 0,001$).

B : les mouches exprimant ExoSGAP dans les hémocytes (*srp-Gal4/+;UAS-ExoSGAP/+* (cercle)) sont plus sensibles à CHA que les mouches contrôles *srp-Gal4/Y* (rond noir) après ingestion de milieu contenant *P. aeruginosa*. ($P < 0,001$).

Nous n'avons pas pu déterminer si les drosophiles exprimant le domaine GAP d'ExoS étaient plus sensibles aux infections par ingestion de bactéries à Gram positif, car même à forte concentration, la bactérie *S. aureus* n'est pas suffisamment virulente pour tuer les mouches par cette méthode (sur 10 jours).

Ces résultats suggèrent un effet d'ExoSGAP dans les hémocytes et potentiellement dans la signalisation entre l'épithélium intestinal et le corps gras ou bien dans l'intégrité de la barrière intestinale (jonction cellulaire...). Il serait possible d'étudier plus précisément les effets sur la barrière intestinale avec des lignées inductrices Gal4 spécifique de l'intestin tel que *cad-Gal4* (*caudal*) qui pourrait permettre d'évaluer les effets d'ExoSGAP sur l'épithélium intestinal.

L'ensemble des résultats obtenus sur la sensibilité aux infections des drosophiles exprimant ExoSGAP au sein de leurs cellules montre qu'ExoSGAP affecte la réponse immunitaire cellulaire et peu ou pas du tout la réponse par le corps gras. Nous avons voulu confirmer ce rôle en nous intéressant d'une part aux voies de signalisation dépendantes de

NF- κ B activées dans les cellules du corps gras et d'autre part aux mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire.

3. ExoSGAP n'affecte pas la synthèse des peptides antimicrobiens dépendante de Relish après infection

Les infections par des bactéries à Gram négatif induisent la synthèse de peptides antimicrobiens dont la diptéricine et l'attacine par le corps gras. L'activation de la diptéricine et des gènes de réponse aux infections dépend de l'activation de la voie Imd et de l'activation du facteur NF- κ B, Relish ainsi que de l'activation de la voie des JNK en aval de TAK1.

Avec Evelyne Bergeret, nous avons regardé l'effet de l'expression ubiquiste d'ExoSGAP sur l'activation des voies Imd/NF- κ B et JNK après infection par CHA et/ou *E. coli* (DH5 α). Par Northern blot, nous avons mesuré l'activation de deux gènes, l'*attacine* et la *dipitéricine*, qui sont des cibles de Relish (NF- κ B). Pour la voie des JNK, la transcription de *puc* (*puckered*) (Silverman et al., 2003) a été mesurée après infection.

Nous avons observé que l'infection par *E. coli* induit la transcription de la *dipitéricine* et de l'*attacine* dans les premières heures de l'infection, la voie Imd est activée rapidement (Fig. I.10). La transcription diminue après 18 heures et retourne au niveau basal, cette décroissance est probablement due à l'élimination des bactéries par les systèmes de défense de la drosophile et à une régulation négative de la réponse immunitaire. L'expression d'ExoSGAP n'a aucun effet sur l'expression des peptides antimicrobiens, donc sur la voie Imd, après infection par *E. coli*. Lorsque les mouches sont infectées par CHA, la transcription de la *dipitéricine* augmente 18 heures post infection (Fig. I.10 A, B). L'expression de l'*attacine* reste au même niveau qu'au cours des premières heures (Fig. I.10 A, C). Là aussi, l'expression d'ExoSGAP n'a aucun effet sur l'activation des voies NF- κ B, confirmant les résultats obtenus avec la *dipitéricine*.

ExoSGAP n'affecte pas la synthèse Imd-NF- κ B dépendante des peptides antimicrobiens après infection par *P. aeruginosa*. Ces résultats ne sont pas en faveur d'un rôle des Rho GTPases dans la régulation de la voie Imd.

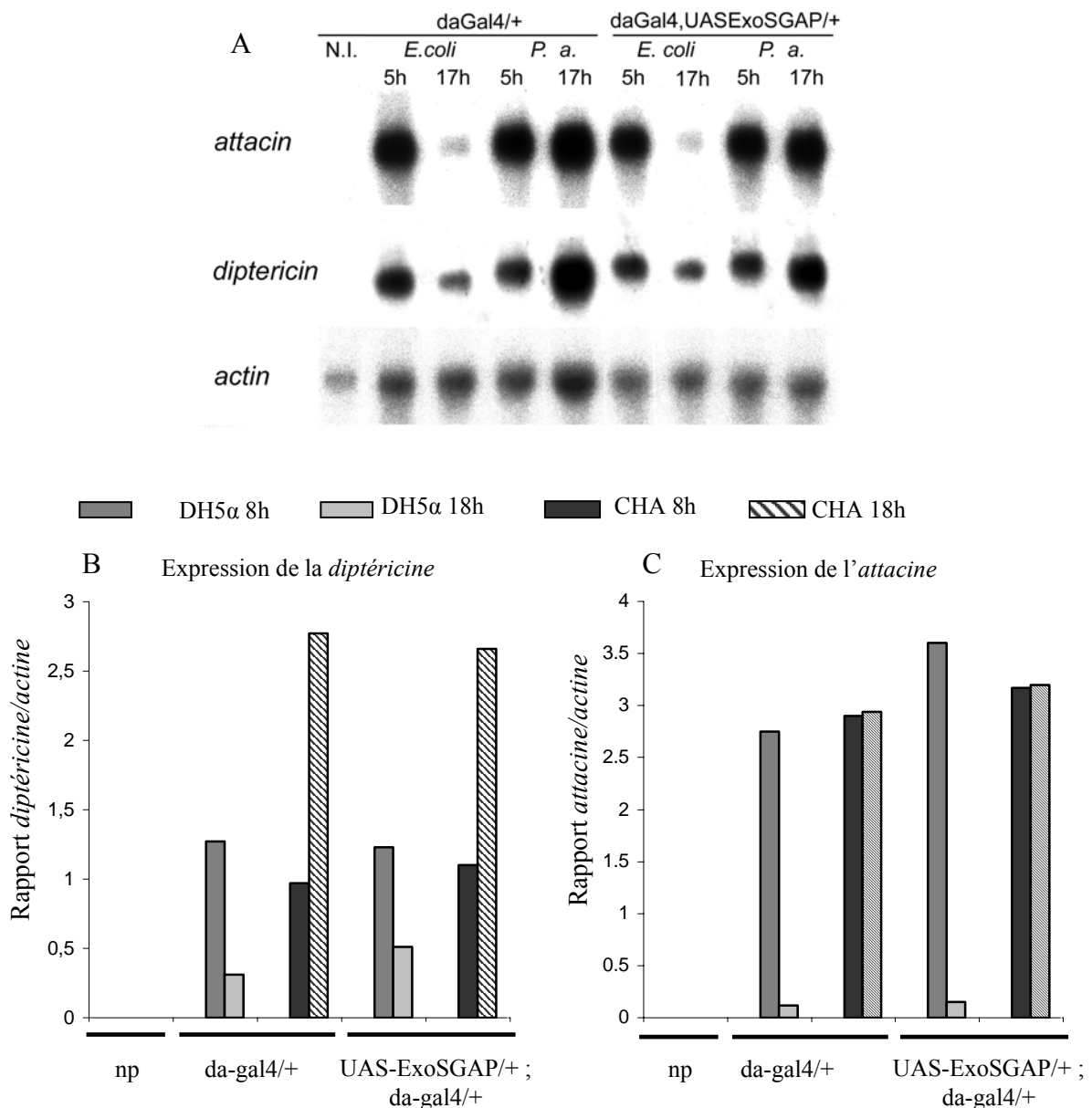


Figure I. 10 : L'expression des peptides antimicrobiens après infection par *P. aeruginosa* n'est pas affectée par l'expression ubiquiste d'ExoSGAP.

Des mouches exprimant ou non ExoSGAP, UAS-ExoSGAP/+ ; da-Gal4/+ et da-Gal4/+ respectivement, ont été infectées par piqûre septique à l'aide d'un culot d'une culture de *E. coli* DH5α (non pathogène) effectuée sur la nuit ou d'une culture de trois heures en phase exponentielle de croissance de *P. aeruginosa* (CHA, *P.a*) diluée à une DO_{600nm} de 0,4. A 5h et 18h, l'ARN de 20 mouches de chaque génotype est extrait, puis l'induction de différents peptides antimicrobiens est évaluée par Northern blot. *L'actine* sert de témoin de charge.

A : Northern blot, B-C : représentation graphique de l'induction de la *diptéricine* et de l'*attacine* respectivement. np : mouches da-Gal4/+ non infectées. L'expression de l'*attacine* et de la *diptéricine* est induite 5 heures après infection aussi bien avec *E. coli* DH5α que CHA. L'expression décroît ensuite avec *E. coli* DH5α à 18 heures, elle reste très haute avec CHA. L'expression d'ExoSGAP n'affecte pas l'expression des peptides antimicrobiens.

Dans le cas de la voie des JNK (Fig. I.11), nous avons observé que l'induction de la voie des JNK est très tardive après infection par *P. aeruginosa* : la transcription *puckered* (*puc*) est importante à 18 heures mais elle n'est pas activée à trois et six heures. D'après la littérature, cette voie est activée très rapidement après infection mais de manière transitoire, ce qui pourrait expliquer l'absence d'activation de la voie des JNK que nous observons (Boutros et al., 2002; Park et al., 2004b). Cette activation tardive de la voie JNK n'a jamais été décrite dans la littérature, il pourrait s'agir d'un emballement des mécanismes de défense qui n'arrivent pas à éliminer le pathogène. L'expression d'ExoSGAP n'affecte pas l'activation tardive des gènes cibles de la voie des JNK.

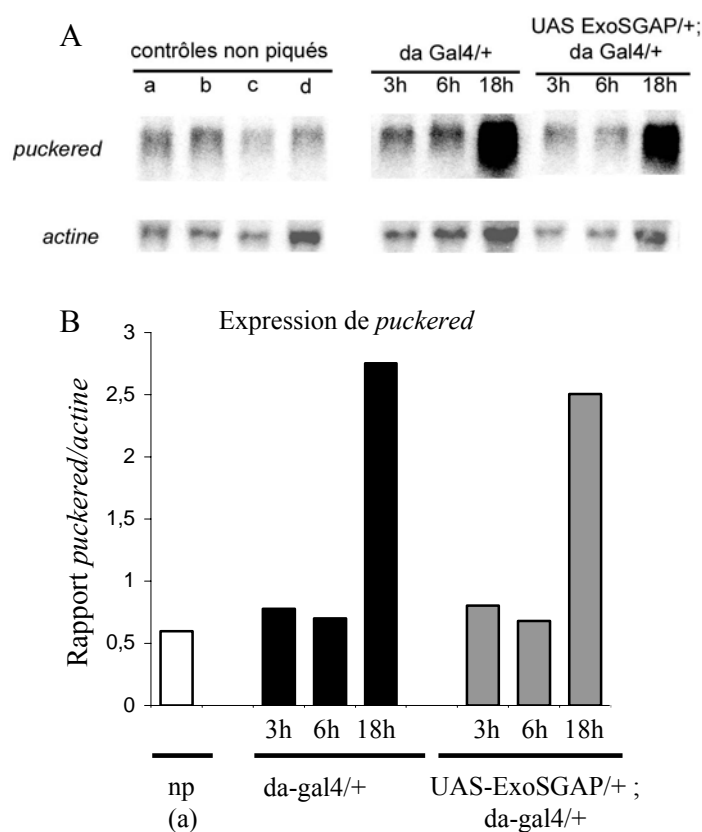


Figure I. 11 : L'induction de la voie des JNK par n'est pas affectée par l'expression ubiquiste d'ExoSGAP après infection par *P. aeruginosa*.

Des mouches exprimant ou non ExoSGAP, UAS-ExoSGAP/+ ; da-Gal4/+ et da-Gal4/+ respectivement, ont été infectées par piqûre septique à partir d'une culture de trois heures en phase exponentielle de croissance de *P. aeruginosa* (CHA) diluée à une DO_{600nm} de 0,4. A 3h 6h et 18h, l'ARN de 20 mouches de chaque génotype est extrait, puis l'induction de différents gènes cibles de la voie des JNK est évaluée par Northern blot.

L'actine sert de témoin de charge.

Contrôle non piqué a : *wi*¹¹¹⁸, b : UAS-ExoSGAP/+ ; da-Gal4/+, c : da-Gal4/+ ; d : UAS-ExoSGAP/Cyo

A : Northern blot, B représentation graphique de *puckered*. np : mouches non infectées ExoSGAP/Cyo. L'expression de *puckered* n'est pas induite 3h et 6h après infection, elle est encore bien plus forte 18 heures post-infection. L'expression d'ExoSGAP n'affecte en rien l'induction de *puckered*.

En conclusion, l'expression d'ExoSGAP n'affecte pas l'activation des voies Imd et JNK après infection par *P. aeruginosa*. Les Rho GTPases cibles d'ExoSGAP ne semblent donc pas avoir un rôle majeur dans l'activation des voies NF- κ B et JNK après infection. Néanmoins son rôle ne peut être exclu, une activité résiduelle des Rho GTPases pourrait être suffisante pour assurer un contrôle normal des voies NF- κ B et JNK.

Des données de la littérature ont montré que l'apoptose induite par ExoS par l'intermédiaire de la voie des JNK, dépend du domaine ADP-ribosyl-transférase de la toxine et non du domaine GAP sur les cellules CHO ou HeLa en culture (Kaufman et al., 2000; Jia et al., 2003). Il serait donc intéressant d'étudier les effets du domaine ADP-ribosyl-transférase (ADPRT) sur la réponse immunitaire chez la drosophile notamment sur la voie des JNK par une approche de transgénèse. Des constructions pP[UAS-ExoSADPRT] ont été réalisées, mais à ce jour aucune lignée transgénique n'a été obtenue.

4. ExoSGAP n'affecte pas l'hématopoïèse mais la phagocytose par les plasmatocytes

L'expression d'ExoSGAP par les cellules de la lignée hématocytaire diminue la résistance des mouches aux infections par piqûre septique ou par ingestion de bactéries à Gram négatif (CHA et CHA::*exsA*) et par des bactéries à Gram positif (*S. aureus*). Des expériences en culture cellulaire ont montré qu'ExoSGAP affectait le cytosquelette d'actine et la phagocytose des bactéries (Goehring et al., 1999; Pederson et al., 1999; Rocha et al., 2003).

Il est donc probable que dans nos expériences ExoSGAP affecte la réponse cellulaire en perturbant soit la multiplication et/ou la différenciation cellulaires, soit la fonction immunitaire des cellules comme par exemple la phagocytose.

Nous avons vérifié la présence des hématocytes chez les larves exprimant ExoSGAP. En collaboration avec le Dr Marie Meister (IBMC, Strasbourg), nous avons montré que l'expression dans les hématocytes d'ExoSGAP avec crq-Gal4 ou srp-Gal4 n'a pas d'effet sur la différenciation et la multiplication de la population des hématocytes et des cellules à cristaux en absence d'infection. Après infection des larves de drosophiles par des œufs de guêpes, les lamellocytes sont normalement présents (résultats non montrés).

ExoSGAP n'affecte donc pas l'hématopoïèse dans les conditions expérimentales testées.

Pour étudier la phagocytose par les plasmatoctes, nous avons utilisé deux approches, *in vivo* en adultes et *ex vivo* à partir d'hémocytes isolés des larves au stade L3.

a. Approche *in vivo* de la phagocytose

Pour l'approche *in vivo*, les mouches adultes ont été injectées avec des particules fluorescentes issues de bactéries à Gram négatif *E. coli* (fluorescein-conjugated *E. coli* K12, molecular probes) (Elrod-Erickson et al., 2000; Rutschmann et al., 2002). Trente à quarante minutes après l'injection, du bleu de trypan 0,4 % (Sigma) a été injecté dans l'hémocoel de la mouche, ce qui permet d'éteindre la fluorescence des particules non phagocytées. On observe ainsi uniquement la fluorescence liée aux bactéries phagocytées par les plasmatoctes. En absence de bleu de trypan, l'ensemble des particules phagocytées et circulantes est visible (Fig. I.12 A).

Chez la drosophile adulte, seuls les plasmatoctes issus de la vie larvaire et embryonnaire sont présents, ils sont plus nombreux le long du vaisseau dorsal dans les segments abdominaux, ils sont aussi présents dans les balanciers et les pattes (Lanot et al., 2001; Holz et al., 2003). Les adultes témoins présentent une forte fluorescence au niveau du vaisseau dorsal, montrant que la phagocytose par les plasmatoctes a été efficace (Fig. I.12 B). Le niveau de fluorescence est plus faible chez les individus exprimant ExoSGAP dans les hémocytes sous le contrôle de *srp-Gal4* (Fig. I.12 C). La phagocytose est donc diminuée et est probablement inhibée par la présence de la toxine.

L'approche *in vivo* ne permet pas de quantifier exactement la diminution de la phagocytose. Le taux de phagocytose peut être évalué par une approche *ex vivo*, à partir d'hémocytes isolées de larves au stade L3, décrite par Pearson et al. (2003).

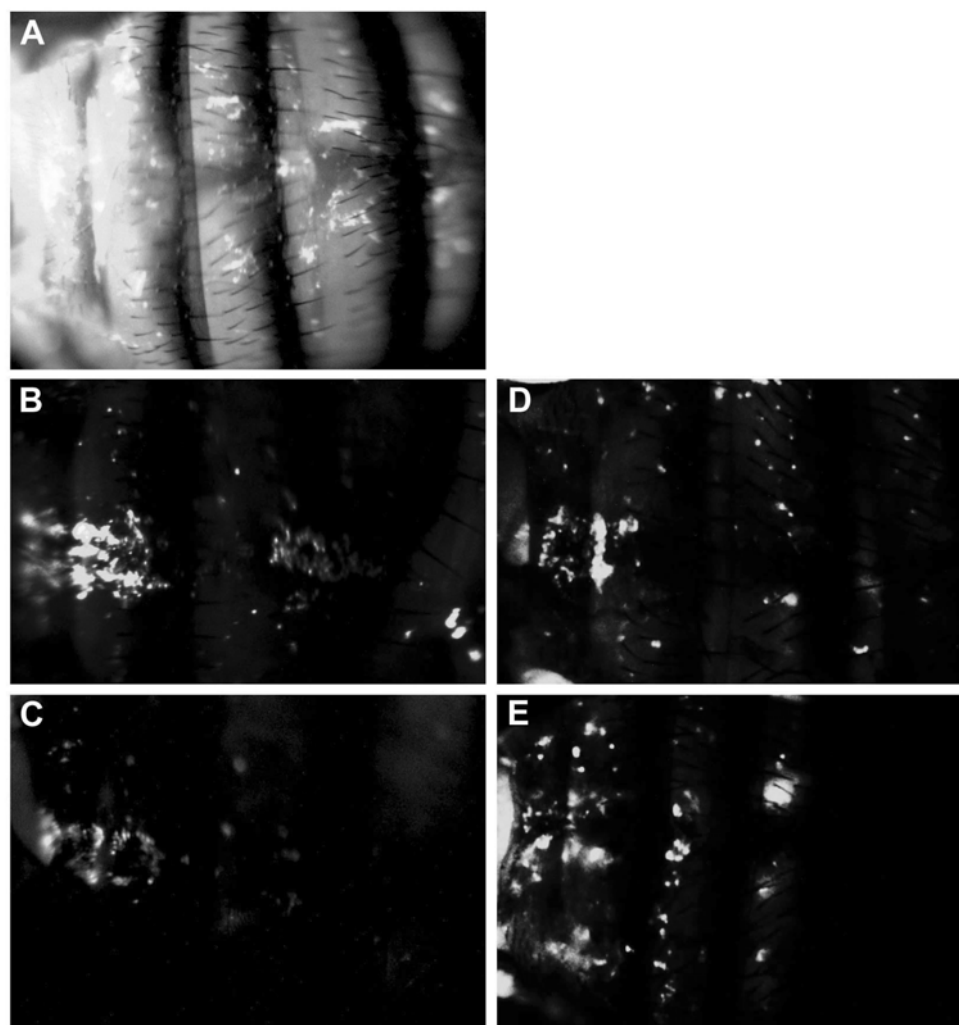


Figure I. 12 : Diminution de la phagocytose *in vivo*, lorsqu'ExoSGAP est exprimé par les hémocytes.

Vue dorsale de l'abdomen de mouches (la partie antérieure est à droite).

A-C : Les mouches ont été injectées avec 82,8 nl de bio-particules de *E. coli* conjuguées à la fluorescéine (10 mg/ml), après 40 minutes les mouches (B, C) ont été injectées avec 480 nl de bleu de trypan 0,4% (Sigma) afin de bloquer la fluorescence des particules non phagocytées.

A : mouches *srp-Gal4/+* avant injection du bleu de trypan. B : mouche contrôle *srp-Gal4/+* après injection de bleu de trypan. La majorité de la fluorescence des particules phagocytées se situe le long du vaisseau dorsal.

B : abdomen d'une mouche *srp-Gal4/+ ; UAS-ExoSGAP/+*, la fluorescence associée aux bactéries phagocytées est diminuée.

D-E : saturation de la phagocytose

Injection 345 nl de bio-particules, puis une heure après injection de 480 nl de bleu de trypan.

D : *srp-Gal4/+*. E : *srp-Gal4/+ ; UAS-ExoSGAP/+*, les hémocytes sont présents dans les deux cas.

Photographies prises à la loupe binoculaire Leica MZ FLIII en utilisant une caméra numérique (Leica DC300F)

b. Approche *ex vivo* de la phagocytose

Brièvement, les hémocytes de cinq larves ont été récupérés en déchirant la cuticule au niveau dorsal postérieur puis déposés dans un puits d'une plaque 96 puits contenant du milieu de culture Schneider. Les cellules sont incubées en présence de bio-particules issues soit de

bactéries à Gram négatif (*E. coli* K12) soit de bactéries à Gram positif (*S. aureus*) pour permettre la phagocytose. Ensuite, le niveau de phagocytose est évalué en comptant le nombre de particules phagocytées sur le nombre total d'hémocytes ayant internalisé ou non des particules (Fig. I.13).

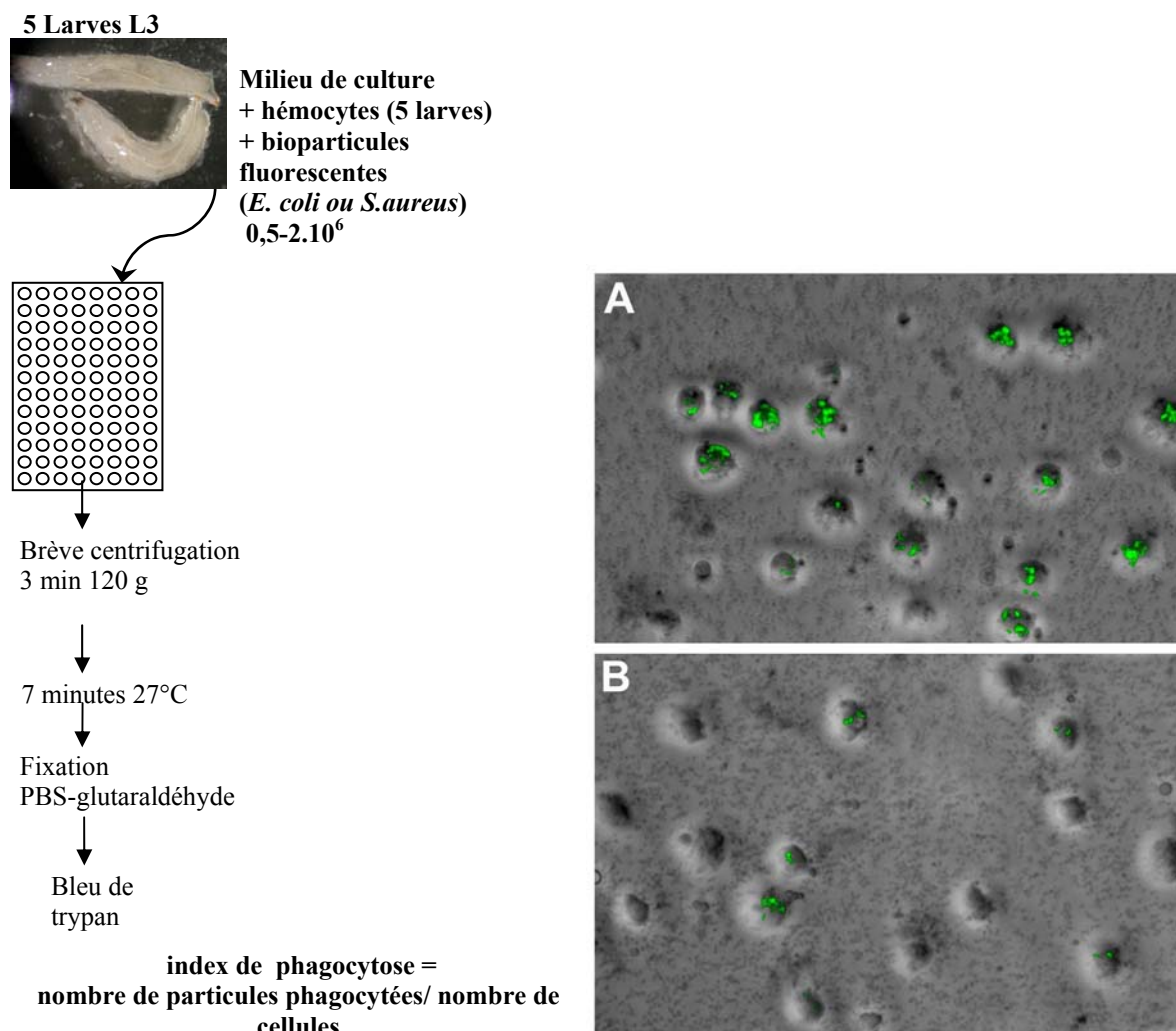


Figure I. 13 : L'expression d'ExoSGAP par les hémocytes inhibe la phagocytose *ex vivo*

Les hémocytes de huit larves au stade L3 sont récupérées et sont mises en présence de particules issues de bactéries à Gram négatif (fluorescein conjugated *E. coli* K12, molecular probes). La fluorescence des particules non phagocytées est arrêtée par ajout d'une solution de bleu de trypan 0,04%.

A : hémocytes contrôles *srp-Gal4/+*, la majorité des cellules ont phagocyté et contiennent plusieurs particules.

B : hémocytes exprimant ExoSGAP *srp-Gal4/+ ; UAS-ExoSGAP/+*, moins de plasmatocytes ont phagocyté et le nombre de particules phagocytées par cellule est plus faible.

Les photographies sont prises au microscope inversé DMIRE2 (Leica) à l'aide d'une caméra numérique (LEICA, DC350F) et du logiciel Leica Qfluoro.

Les hémocytes exprimant ExoSGAP sous le contrôle de *srp-Gal4* présentent un niveau de phagocytose diminué de 52% (+/- 8%) pour les particules de *E. coli* (Tab. I.1) et de 44% (+/-2%) (Tab. I.2) pour les particules de *S. aureus*. Le domaine GAP de la toxine ExoS inhibe donc la phagocytose indépendamment du type bactérien.

L'effet d'ExoSGAP est observé aussi bien sur le nombre de particules phagocytées que sur le nombre d'hémocytes ayant internalisé des particules (Fig. I.13 B comparé à A).

Tableau I. 1 : L'expression dirigée d'ExoSGAP avec *srp-Gal4* inhibe la phagocytose des particules mortes de *E. coli* couplées à la fluorescéine

Genotype	Nombres de plasmatoctes	Particules phagocytées de <i>E. coli</i>	Index de phagocytose
<i>srp-Gal4/Y</i> ; UAS-ExoSGAP/+	177	159	0,898
	157	182	1,159
	160	106	0,662
	184	130	0,706
	367	287	0,782
	Total = 1045	Total = 864	Moyenne = 0,842 +/-0,199
<i>srp-Gal4/Y</i>	118	255	2,161
	117	207	1,769
	109	216	1,982
	120	165	1,375
	409	568	1,389
	Total = 873	Total = 1411	Moyenne = 1,735 +/-0,351

Le tableau 1 est le résultat de cinq comptages d'une des trois expériences. Taux d'inhibition (%) = 51,5% ($P < 0,002$) calculé avec la formule suivante : $100 - (\text{index moyen de } \textit{srp-Gal4/Y}; \text{UAS-ExoSGAP}/+ \times 100 / \text{index moyen de } \textit{srp-Gal4/Y})$

Tableau I. 2 : L'expression dirigée d'ExoSGAP avec *srp-Gal4* inhibe la phagocytose des particules mortes de *S. aureus* couplées à la fluorescéine

Génotype	Nombres de plasmatoctes	Particules phagocytées de <i>S. aureus</i>	Index de phagocytose
<i>srp-Gal4/Y</i> ; UAS-ExoSGAP/+	122	144	1,18
	112	125	1,116
	115	91	0,791
	74	87	1,176
	127	147	1,157
	Total = 550	Total = 594	Moyenne = 1,084 +/-0,166
<i>srp-Gal4/Y</i>	113	230	2,035
	98	216	2,204
	107	206	1,925
	118	272	2,305
	79	118	1,493
	Total = 515	Total = 1042	Moyenne = 1,992 +/-0,315

Le tableau 2 est le résultat de cinq comptages d'une des trois expériences. Taux d'inhibition (%) = 45,5% ($P < 0,001$) calculé comme dans le Tableau 1.

Afin de confirmer ce résultat, nous avons utilisé un autre inducteur spécifique des plasmatoctes (crq-Gal4). Là encore, l'expression d'ExoSGAP par les hémocytes larvaires diminue de 42,9 % (+/- 2,6 %) (Tab. I.3) pour *E. coli* et de 34,4% (+/- 3 %) (Tab. I.4) pour *S. aureus*. La différence d'inhibition entre les deux expériences peut s'expliquer par le fait que srp-Gal4 est un inducteur plus fort que crq-Gal4 (Dr M. Meister, communication personnelle).

Tableau I. 3 : L'expression dirigée d'ExoSGAP avec crq-Gal4 inhibe la phagocytose des particules mortes de *E. coli* couplées à la fluorescéine

Génotype	Nombres de plasmatoctes	Particules phagocytées de <i>E. coli</i>	Index de phagocytose
crq-Gal4/ UAS-ExoSGAP	98	142	1,449
	112	137	1,223
	100	125	1,25
	90	109	1,211
	92	102	1,109
	Total=492	Total=615	Moyenne = 1,248+/-0,124
crq-Gal4/+	86	183	2,128
	102	266	2,608
	112	233	2,08
	139	378	2,719
	81	190	2,346
	Total=520	Total=1250	Moyenne = 2,376+/-0,284

Le tableau 3 est le résultat de cinq comptages d'une des trois expériences. Taux d'inhibition (%) = 47,5 % (P<0,002), calculé comme dans le Tableau 1.

Tableau I. 4 : L'expression dirigée d'ExoSGAP avec crq-Gal4 inhibe la phagocytose des particules mortes de *S. aureus* couplées à la fluorescéine

Génotype	Nombres de plasmatoctes	Particules phagocytées de <i>S. aureus</i>	Index de phagocytose
crq-Gal4/ UAS-ExoSGAP	114	185	1,623
	95	189	1,989
	114	130	1,140
	120	133	1,108
	90	116	1,289
	410	557	1,359
	Total=943	Total=1310	Moyenne = 1,418+/-0,335
crq-Gal4/+	80	188	2,350
	101	267	2,644
	101	205	2,030
	99	164	1,657
	119	298	2,504
	376	876	2,330
	Total=876	Total=1998	Moyenne = 2,252+/-0,357

Le tableau 4 est le résultat de six comptages d'une des trois expériences, Taux d'inhibition (%) = 37% (P<0,002) calculé comme dans le Tableau 1.

Un contrôle expérimental a été effectué en incubant les cellules avec de la cytochalasine D, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine. En présence de cytochalasine D, très peu de particules fluorescentes sont présentes dans les cellules donc la phagocytose est bien inhibée (résultat non montré). Dans nos expériences, les particules qui restent fluorescentes correspondent donc bien à des particules phagocytées.

ExoSGAP affecte la réponse cellulaire en inhibant notamment la phagocytose. Son effet est très important, le taux d'inhibition de l'ordre de 45 % est proche de celui que Pearson et coll. ont observé avec le mutant dSCAR qui code un élément régulateur du cytosquelette d'actine (i.e. taux d'inhibition de 60%) (Pearson et al., 2003). Les Rho GTPases qui sont les cibles d'ExoSGAP sont connues pour contrôler le dynamisme du cytosquelette d'actine lors de la phagocytose et la migration cellulaire indépendamment du type bactérien. L'effet d'ExoSGAP peut donc s'expliquer par le fait que cette toxine perturbe la réorganisation du cytosquelette d'actine via les Rho GTPases (Pederson et al., 1999; Krall et al., 2002).

Nos résultats suggèrent également que la phagocytose contribue fortement à la lutte contre des bactéries pathogènes virulent. Cependant, elle n'est pas essentielle lors d'une infection par des bactéries non pathogènes puisque ni l'expression de la toxine ni la mutation *domino* ne suffisent à provoquer une sensibilité à une bactérie non pathogène comme *E. coli* (Braun et al., 1998). La synthèse des peptides antimicrobiens après infection par piqure septique doit suffire à l'élimination des bactéries non pathogènes.

IV. Conclusion

Nous avons montré *in vivo* l'effet inhibiteur d'ExoSGAP sur la réponse immunitaire de l'hôte. La toxine affecte spécifiquement la réponse immunitaire cellulaire, en inhibant entre autre la phagocytose des bactéries. Les plasmatocytes jouent un rôle important, en réponse aux infections par ingestion : l'expression d'ExoSGAP dans ces cellules diminue la résistance des mouches aux infections. Les hémocytes de drosophiles possèdent de nombreuses homologues avec les cellules leucocytaires des mammifères (Tirouvanziam et al., 2004). ExoSGAP affecte probablement de la même manière la réponse immunitaire cellulaire chez la drosophile que chez les mammifères. D'une part, ExoSGAP affecte aussi bien la phagocytose par les hémocytes que par les lignées murines de cellules de type macrophage (J714) (Rocha et al., 2003). Par ailleurs, chez les patients atteints de mucoviscidose, ce sont

les poumons qui sont envahis par les bactéries. Ces bactéries affectent notamment le fonctionnement des neutrophiles polymorphonucléaires, qui sont notamment présents au site d'infection (Dacheux et al., 1999). La sécrétion d'ExoS par *P. aeruginosa* pourrait inhiber la phagocytose par les neutrophiles, mais aussi perturber les voies de signalisation de la réponse inflammatoire activées par les cellules phagocytaires. ExoSGAP peut agir sur de nombreux processus nécessaires à la réponse immunitaire, les Rho GTPases ont été décrites comme ayant un rôle important dans les voies de signalisation dépendant des TLRs (Toll like receptor) et dans l'activation des p38MAPK et JNK. Chez les mammifères, Rac2 est un activateur de la NADPH-oxydase (Bishop et Hall, 2000; Bokoch, 2005). Les outils génétiques disponibles chez la drosophile permettent d'étudier directement dans les tissus de la réponse immunitaire les effets d'ExoSGAP sur les voies de signalisation contrôlées par les Rho GTPases.

Notre étude montre que la drosophile peut servir de modèle pour comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires affectés par les toxines bactériennes de type III. La construction de lignées transgéniques pouvant exprimer de manière inducible une toxine permet sa caractérisation au sein d'un organisme entier en s'affranchissant des autres mécanismes de virulence.

Ce système est adaptable à n'importe quelle toxine et peut permettre la caractérisation de toxines de fonction peu ou non connue comme ExoU.

RESULTATS

CHAPITRE 2

RECHERCHE DE MODIFICATEURS DU PHENOTYPE ASSOCIE A EXOSGAP

I. Introduction

Des publications ont montré l'effet d'ExoSGAP sur la dynamique de l'actine, en affectant soit la morphologie cellulaire soit la fonction de la cellule comme la phagocytose (Rocha et al., 2003). La majorité des études s'est intéressée aux effets de la toxine sur le comportement cellulaire, peu de choses sont connues sur les processus moléculaires et les voies de signalisation en aval des Rho GTPases ciblées par le domaine GAP de l'exoenzyme.

Les membres de la famille des Rho GTPases, ciblées par la toxine, interviennent dans l'activation de nombreuses voies de signalisation impliquant notamment les JNK, les p38MAPK, l'activation des facteurs NF- κ B (Bishop et Hall, 2000). Elles sont aussi nécessaires à la régulation de la dynamique de l'actine (Hall, 1998). De plus les Rho GTPases ont été montrées comme participant à la régulation des voies TLRs chez les mammifères (Arbibe et al., 2000; Equils et al., 2004). L'activité des GTPases dépend des facteurs d'échange et des protéines de type GAP. Plusieurs données de la littérature montrent que les GAPs pourraient avoir un rôle dans le choix par les GTPases des voies de signalisation ou processus contrôlés (Jullien-Flores et al., 1995; Kozma et al., 1996; Raymond et al., 2004).

Chez la drosophile, l'obtention d'un phénotype externe suffisamment fort lorsqu'ExoSGAP est exprimé dans l'aile ou dans l'œil, permet par croisement avec des lignées transgéniques (surexpression de gènes) ou mutantes, de rechercher des modificateurs du phénotype qui vont soit l'augmenter soit le supprimer (Fig. II.2B et II.3 C). Ceci peut aboutir à l'identification des voies de signalisation dépendantes des Rho GTPases affectées spécifiquement par la toxine dans la cellule et de mettre ainsi en évidence des cofacteurs ou des gènes cibles d'ExoSGAP.

Nous avons utilisé trois approches pour l'identification de gènes codant des partenaires génétiques d'ExoSGAP.

- Une mutagenèse de dérégulation pour rechercher les partenaires de RacGAP84C avait été effectuée auparavant au laboratoire en criblant une collection de 2000 lignées contenant des éléments P[UAS]. Ce crible avait permis l'identification de gènes impliqués dans la signalisation dépendante des GTPases dont la surexpression augmentait ou diminuait le phénotype associé à l'expression de RacGAP84C dans l'œil (Raymond et al., 2004).

J'ai donc décidé de rechercher d'éventuelles cibles d'ExoSGAP parmi une cinquantaine de lignées conservées lors de ce crible.

- J'ai choisi de tester en interaction avec ExoSGAP, environ 105 lignées contenant l'élément P[y⁺,UAS] (UY). Ces lignées correspondent aux lignées isolées par l'équipe du Dr. Hervé Tricoire sur un test de sensibilité ou résistance au stress oxydant (Monnier et al., 2002a; Monnier et al., 2002b). Dans les leucocytes de type macrophage des mammifères (neutrophiles, macrophages...), les GTPases Rac sont nécessaires à l'activation de la NADPH-oxydase. La toxine pourrait agir en aval de la signalisation conduisant à l'activation de cette enzyme (Lambeth, 2004). Ainsi, Les Rho GTPases participent à la production d'espèces réactives de l'oxygène et donc au déclenchement d'un stress oxydant. Les espèces réactives de l'oxygène produites par la NADPH-oxydase participent à la destruction des pathogènes et à la transduction du signal, elles induisent la production de cytokines en activant notamment des voies NF-κB. Ainsi, la production des ions superoxydes dépend des Rac et participe à la régulation de voies de signalisation de la réponse inflammatoire.

- Nous avons aussi utilisé une approche de recherche de gènes candidats parmi certains éléments connus comme participant aux voies de signalisation de la réponse immunitaire.

II. Méthodologie

L'insertion des éléments P chez la drosophile se fait au hasard dans le génome, avec une insertion préférentielle dans les séquences 5' régulatrices des gènes. La présence des séquences UAS en aval d'un promoteur minimum permet, lorsque l'on apporte par croisement le facteur de transcription de levure Gal4, la transcription des gènes situés à proximité (Rorth, 1996). Ceci permet une expression ectopique de ces gènes cibles. L'insertion peut selon le site conduire à une perte totale ou partielle de la fonction du gène où se situe l'élément P. Les insertions dans les régions régulatrices ou le 5' UTR, si elles sont dans le bon sens, vont permettre la transcription du gène associé.

Le principe du crible consiste à rechercher des gènes endogènes (lignées EP ou UY) dont la dérégulation augmente ou supprime le phénotype induit par l'expression d'ExoSGAP dans l'aile ou dans l'œil (Fig. II.1).

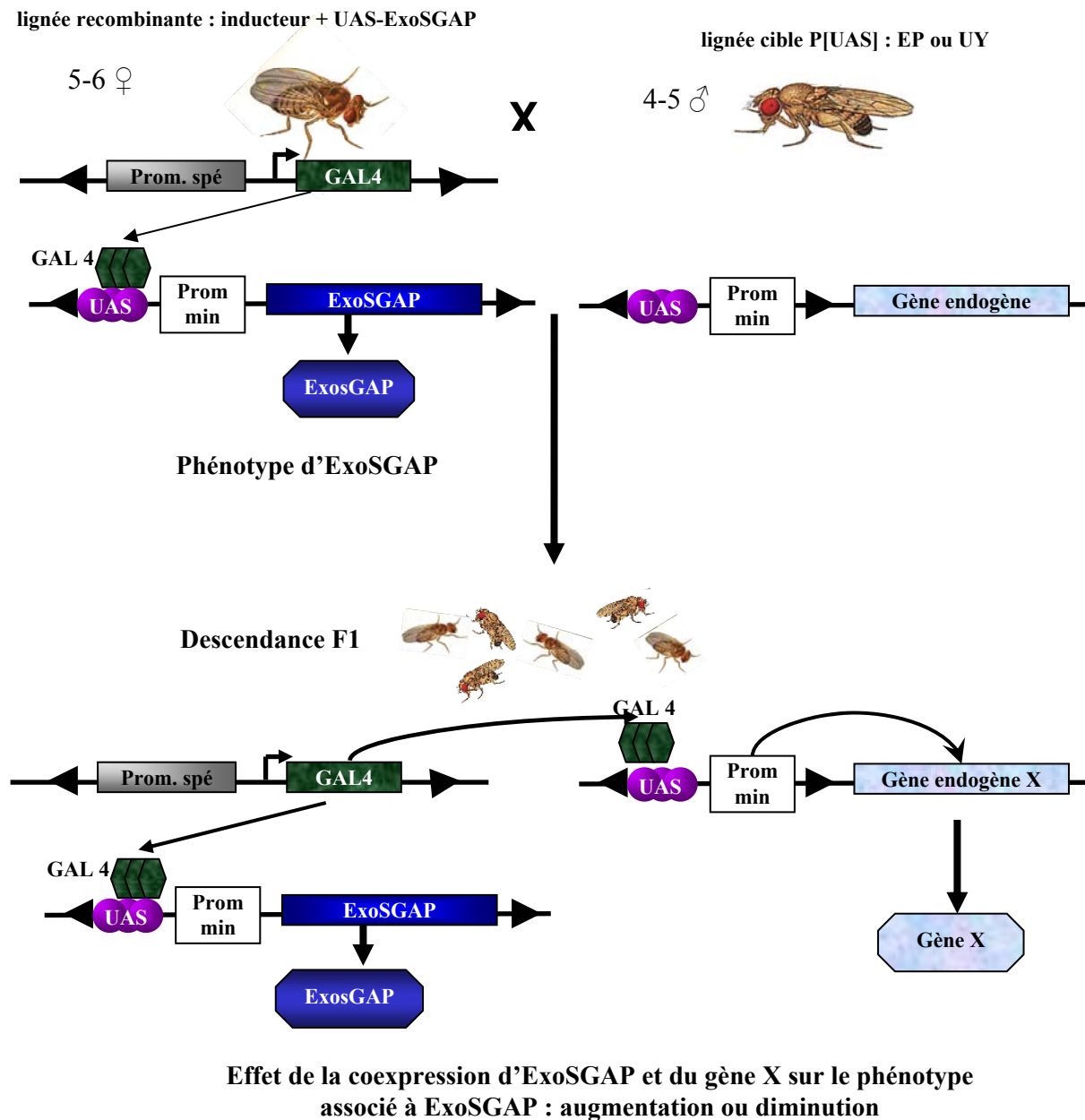


Figure II. 1 : Principe de la mutagenèse de dérégulation et de recherche des partenaires génétiques d'ExoSGAP (Rorth, 1996)

La lignée recombinante possède à la fois l'inducteur Gal4 sous le contrôle d'un promoteur tissu spécifique (en-Gal4 ou GMR-Gal4 pour le crible) ainsi que le transgène UAS-ExoSGAP. Cette souche a été obtenue par recombinaison méiotique, afin d'avoir deux transgènes sur un même chromosome, le transgène UAS-ExoSGAP est exprimé en fonction de l'expression du facteur Gal4. La lignée cible contient un transgène P[UAS] inséré au hasard dans son génome, l'élément P ayant tout de même une préférence d'insertion pour les séquences régulatrices des gènes endogènes. Le croisement de ces deux lignées va permettre de coexprimer à la fois ExoSGAP ainsi que le gène situé en aval du P[UAS]. On peut ainsi chercher des gènes endogènes dont la dérégulation va supprimer ou augmenter le phénotype induit par l'expression d'ExoSGAP. Il existe de nombreuses lignées possédant dans leur génome une insertion au hasard d'un élément P[UAS] qui peut servir à effectuer des mutagenèses de dérégulation.

Prom. Spé : promoteur tissu spécifique, Prom min : Promoteur minimum

J'ai construit des lignées recombinantes de drosophiles par recombinaison méiotique classique avec trois éléments P différents portés par le chromosome II : l'inducteur Gal4 sous le contrôle du promoteur soit *GMR* (GMR-Gal4) ou *engrailed* (en-Gal4) est recombiné successivement avec deux insertions différentes de UAS-ExoSGAP (Fig. II.2 B et Fig. II.3 C respectivement). La présence de deux copies d'ExoSGAP permet d'avoir un phénotype de départ plus fort qu'en présence d'une seule copie, ce qui rend le crible plus facile et efficace. Ces lignées sont ensuite croisées avec les différentes lignées P UY ou EP, à 25°C et dans certains cas à température ambiante. La descendance, qui coexprime ExoSGAP et le gène cible au cours de la formation des yeux ou de l'aile, est ensuite observée pour rechercher une modification du phénotype lié à ExoSGAP. Les lignées sélectionnées ont été retestées afin d'éliminer les faux positifs.

Les gènes candidats sélectionnés sont présentés dans le tableau II.1 pour la mutagenèse de dérégulation. Finalement, j'ai utilisé une approche par perte de fonction pour confirmer les interactions avec certains de ces gènes (Tab. II.2).

III. Résultats

Tableau II. 1 : Partenaires génétiques d'ExoSGAP

	Lignées	GMR-Gal4,UAS-ExoSGAP (2 copies)	en-Gal4, UAS-ExoSGAP (2 copies)	Position cytologique	Localisation de l'insertion	Fonction du gène
A. voies dépendantes des Ras, Rho, Rac						
➤ <i>MESR2 : A kinase anchor protein</i>	EP(2)2254	Pas d'effet	(*) Enhancer	29C3-4	114 pb avant début de l'ARNm	Suppresseur du signal constitutif de la voie Ras/MAPK.
	EP(2)2072	(*) Enhancer	Enhancer	29C3-4	29 pb après début du transcrit dans le 5'UTR	
➤ <i>MESR4 : misexpression of Ras4</i>	EP(3)386	Pas d'effet	Suppresseur	54C3-7	573 pb avant le début de l'ARNm	Suppresseur du signal constitutif de la voie Ras/MAPK, régulation de la transcription
➤ CG31012 ou CG11316	EP(3)3700	Suppresseur	ND	100A6	15 bp après le début de transcription dans le 5'UTR du transcrit RC.	Domaine SH3
➤ <i>Grapes (grp)</i>	EP(2)587	Enhancer	ND	36A10	Dans le premier intron du transcrit RA, à 560 pb du codon start.	Sérine/Thréonine kinase, fonction dans la réparation de l'ADN
➤ <i>CG7097</i>	EP(2)2445	(*) Enhancer	(*) Enhancer	56C1-4	44 pb du début de l'ARNm	Récepteur S/T kinase, homologies avec la S/T kinase ste20
➤ <i>GEF (64C)</i>	EP(3)3035	Suppresseur	Suppresseur	64B13-17	Dans le premier exon non codant (26 pb) (5'UTR)	RhoGEF

* lignées présentant un phénotype seul avec en-Gal4 ou GMR-Gal4, (*) lignées présentant un phénotype faible seul avec en-Gal4 ou GMR-Gal4

Colonne 2 : correspond aux noms des lignées testées soit des lignées EP, soit UY, soit des lignées transgéniques UAS-gène X.

ND : effet non déterminé. Effet de la dérégulation des gènes sur le phénotype associé à ExoSGAP dans l'oeil (GMR-Gal4, UAS-ExoSGAP (2copies)) ou dans l'aile (en-Gal4, UAS-ExoSGAP (2 copies)).

Le système Gal4 est capable d'induire des gènes jusqu'à 10 kb de l'insertion de l'élément P dérégulateur (Nicolai et al., 2003).

Les sites d'insertion des éléments P (EP) déterminés grâce aux informations données par le Berkeley Drosophila Genome Project (<http://flybase.bio.indiana.edu>)

Tableau II. 1 (suite) : Partenaires génétiques d'ExoSGAP

Lignées	GMR-Gal4,UAS-ExoSGAP (2 copies)	en-Gal4, UAS-ExoSGAP (2 copies)	Position cytologique	Localisation de l'insertion	Fonction du gène
A. Voie des MAPK/Ras Kinase					
➤ <i>Pebble</i> (Rho GEF)	EP(3)3415	* Létal en interaction avec ExoSGAP	66A18-19	Dans le 5' UTR, 457 pb avant le codon start	RhoGEF
➤ <i>Yan/Aop anterior open</i>	EP(2)2500	* Enhancer	22D1	34 pb avant le début de transcription du transcrit AOP-PA et 17 kb avant début du transcrit AOP-PB	Rétrocontrôle négatif de la voie des JNK ; facteur de transcription
B. voie de la réponse immunitaire et hématopoïèse					
➤ <i>imd</i>	UAS-imd	(*) Enhancer Pas d'effet	/	/	Element de la voie Imd
➤ <i>cactus</i>	UY1363	Suppresseur	37F9-11	A 365 pb du début du gène	I-κB inhibiteur des facteurs NF-κB Dif et Dorsal
➤ <i>cGMP kinase CG10033 foraging (for)</i>	UY3121	Suppresseur	24A2-4	87 pb en amont du transcrit T2A du gène CG10033, interrompt potentiellement les transcrits T1 et T3	Sérine/Thréonine Kinase activée GMPc dont la production peut dépendre du signal NO
➤ <i>domino</i>	EP(2)2371	Enhancer	57D11	24 pb avant début de transcription de <i>domino</i>	Facteur de remodelage de l'ADN, différenciation des hématocytes
➤ <i>Traf2 TNF-receptor-associated factor2</i>	EP(X)325	Enhancer	7D16	258 pb avant le début de l'ARNm	Protéine intracellulaire en aval du récepteur au TNF.

Tableau II.1 (suite) : Partenaires génétiques d'ExoSGAP

	Lignées	GMR-Gal4, UAS-ExoSGAP (2 copies)	en-Gal4, UAS-ExoSGAP (2 copies)	Position cytologique	Localisation de l'insertion	Fonction du gène
C. apoptose						
<i>Tms1d</i> target of methylation induced silencing	EP(3)807	Suppresseur	Suppresseur	72E5-F1	1075 pb du début de l'ARNm de <i>Tms1d</i>	Récepteur membranaire, dont l'homologue humain possède un domaine de liaison aux caspases (CARD) Mort cellulaire liée aux caspases
<i>Traf1</i> TNF-receptor-associated factor1	EP(2)578	* pas d'effet (additif)	Suppresseur	24E4	33 pb en amont du début du gène	Protéine intracellulaire en aval du récepteur au TNF.
CG17962 Z600 CG7266 <i>Ecdysone-induced protein</i> 28/29kD (<i>Eip71CD</i>)	UY1597	* pas d'effet (additif)	Suppresseur	71C4-D1	A 874 pb et 2832 pb du début de transcription des gènes CG17962 et CG7266 respectivement	CG17962 : pas de fonction connue <i>Eip71CD</i> : protéine-méthionine-S-oxyde réductase, mort cellulaire et autophagie, réponse au stress
D. cytosquelette et trafic cellulaire						
<i>cdi</i> (center divider) TESK1	EP(3)3319	Suppresseur	Suppresseur	91E4-F1	Dans le premier exon non codant	S/T kinase, régulation du cytosquelette d'actine, orthologue à TESK1
CG10542	EP(3)711	** suppression du phénotype lié à EP(3)711	Létal seul, suppression de la létalité par ExoSGAP	64E8	22 pb avant début le début de l'ARNm	Présence d'un domaine RING et similitude avec la chaîne lourde de la myosine humaine
<i>Myo31DF</i> (myosine 31DF)	EP(2)2491	Pas d'effet	Enhancer	31F3	7 pb avant le début de l'ARNm	Myosine ATPase
<i>Beached1</i> (<i>bchs blue cheese</i>)	EP(2)2299	* pas d'effet (additif)	Suppresseur	26A1	Dans le premier intron, 822 pb après le codon start	Voie endocytaire : transport lysosomal et ciblage protéique
CG8583	UY2299	*Enhancer	Enhancer	65F7	64 pb en amont du gène	Protéine transmembranaire du Réticulum endoplasmique pour le ciblage protéique. Homologie avec la protéine humaine de translocation SEC63

Tableau II.1 (suite) : Partenaires génétiques potentiels d'ExoSGAP

	Lignées	GMR-Gal4, UAS-ExoSGAP (2 copies)	en-Gal4, UAS-ExoSGAP (2 copies)	Position cytologique	Localisation de l'insertion	Fonction du gène
E. autres						
➤ CG4357	UY1744	Suppresseur	Suppresseur	69B3	à 129 pb (environ) en aval du début de transcription	Transporteur baso latéral Na-K-Cl Cotransporteur Na-(K)-Cl bumétanide sensible
	UAS-1744 3	Suppresseur	Suppresseur			
➤ CG13512	EP(2)718	Suppresseur	Pas d'effet	58F4	55 pb en amont du début de transcription	Fonction inconnue, homologie avec des protéines Litaf (LPS-induced tumour necrosis factor α factor)
➤ CG30269 ou CG13515	EP(2)2404	Suppresseur	Suppresseur	58F6		Protéine avec des homologies avec Litaf (LPS-induced tumour necrosis factor α factor)
➤ CG5261	EP(2)816	Suppresseur	Suppresseur	27F1-6	3,1 kb avant le début du transcrit	Dihydrolipo-amideS-acetyl transférase
➤ CG2017	EP(3)3503	Suppresseur	Suppresseur	83C5-6	dans le premier premier intron et à 903 pb du codon start du transcrit RA, RC, RD dans le 5'UTR du transcrit RB	Facteur d'élongation liant le GTP
➤ CG6701	EP(2)2054	Pas d'effet	Suppresseur	50C22	680 pb avant le début de l'ARNm	Domaine à doigt de zinc de type C2H2
➤ CG5338 ribosomal protein S19b (RpS19b)	UY2812	Suppresseur	Suppresseur	95C13	A 27 pb en amont de CG5338	CG5338 : composant cytosolique de la petite sous-unité ribosomale
CG5854					356 pb en amont de CG5854	CG5854 : pas de fonction connue, quelques homologies avec une UDP-glucose 4-épimérase
➤ non déterminée	UY718	* Probablement additif	Suppresseur	-	Insertion non déterminée	-

Tableau II. 2 : Effet de la perte de fonction des gènes candidats sur le phénotype associé à ExoSGAP

	mutation	GMR-Gal4, UAS-ExoSGAP (2 copies)	en-Gal4, UAS-ExoSGAP (2 copies)	Fonction du gène
A. Voie des MAPK/Ras Kinase				
➤ <i>Traf2</i>	Excision de l'élément P : <i>ExP99.41</i>	Pas d'effet	Pas d'effet	Protéine intracellulaire en aval du récepteur au TNF.
➤ <i>grapes</i> (<i>grp</i>)	<i>grp</i> ⁶⁰³⁴	Pas d'effet	Pas d'effet	S/T kinase, fonction dans la réparation de l'ADN
➤ <i>SNF/AMP-activated protein S/T, sous unité gamma</i>	<i>P/SUPor-P/SNF44</i> ^{γP(KG00325)}	Léger suppresseur	Suppresseur	S/T kinase activée par l'AMP, fonctionne comme un senseur métabolique chez la levure
➤ <i>GEF (64C)</i>	<i>GEF(64C)</i> ^{ems1}	suppresseur	Suppresseur	RhoGEF
➤ <i>Pebble</i> (Rho GEF)	<i>pb</i> ^{l15} cold sensitive	Léger enhancer	Léger enhancer	RhoGEF
➤ CG31012	<i>P/SUP-or-P/CG31012P</i> ^(KG05741)	Suppresseur léger	Pas d'effet	SH3 domain
➤ <i>jun</i>	<i>jun</i> ²	Pas d'effet	Suppresseur	Voie des JNK, facteur de transcription, sous-unité du complexe AP-1
➤ <i>basket</i>	<i>bsk</i> ^l	pas d'effet		JNK (jun kinase)
B. Réponse immunitaire / stress oxydant				
➤ <i>cactus</i>	<i>Cac</i> ⁴	Pas d'effet	Pas d'effet	Protéine de type I-κB, séquestrant les facteurs NF-κB Dif et Dorsal, inhibiteur de la voie Toll.
C. Apoptose				
➤ <i>dredd</i>	<i>dredd</i> ^{bit}	Pas d'effet	Suppresseur	Homologie avec la caspase-8, peut conduire à l'apoptose ou à l'activation de Relish lors de l'activation de la voie Imd.
D. Cytosquelette et trafic				
➤ <i>cdi</i> (center divider) TESK1	<i>cdi</i> ^{R47}	Pas d'effet	Pas d'effet	S/T kinase orthologue à TESK1
➤ <i>Beached1</i>	<i>Df(2L)c17</i> (25E-26A)	Augmentation	Suppresseur	Voie endocytaire, croissance neuronale
F. facteurs de remodelage de l'ADN				
➤ <i>domino</i>	<i>dom</i> ^{P(K08108)}	Pas d'effet	Pas d'effet	Facteur de remodelage de l'actine, différenciation des hémocytes
E. autres				
➤ CG4357	<i>UY1744</i> ^{ev10} (excision de UY1744 létal)	Pas d'effet	Pas d'effet	Canal : Na K Cl transporteur, peut agir sur le cytosquelette,

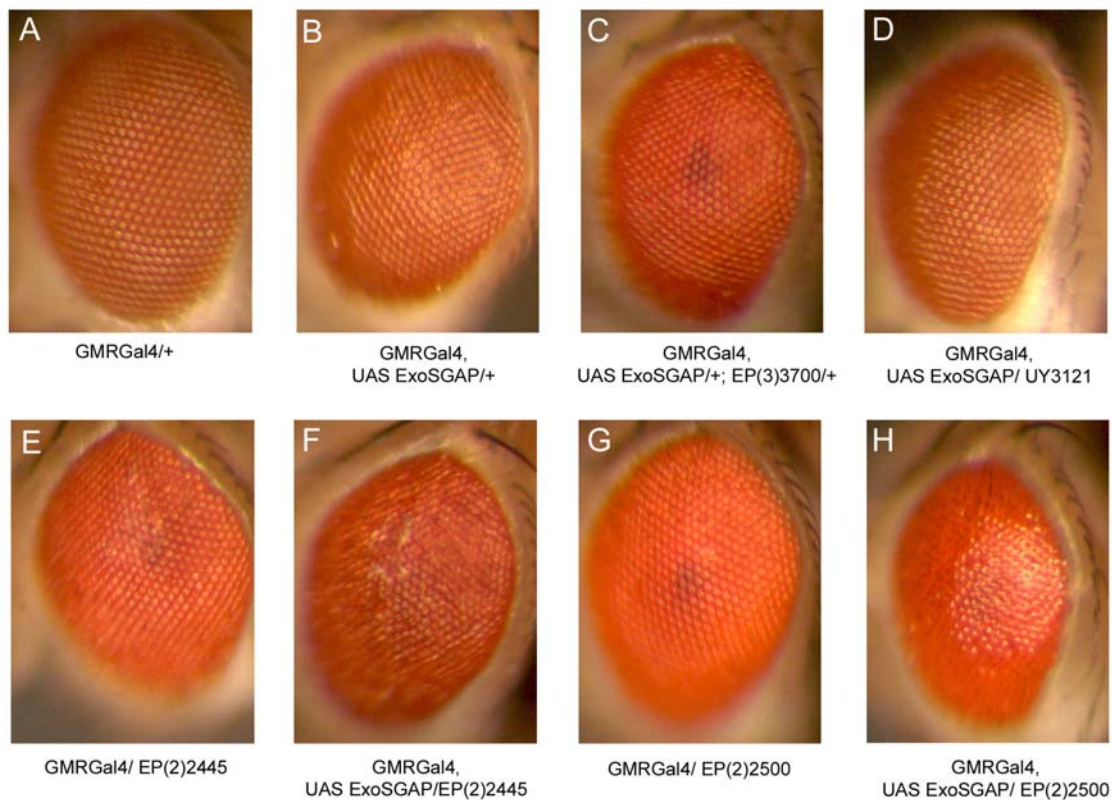


Figure II. 2 : Exemples de quelques gènes candidats modifiant le phénotype lié à l'expression d'ExoSGAP dans l'œil (25°C) (grossissement x4)

A : GMR-Gal4/+ œil contrôle. B : GMR-Gal4,UAS-ExoSGAP(2 copies)/+ l'œil est légèrement rugueux.

C-D : suppresseur du phénotype associé à ExoSGAP

Le phénotype associé à ExoSGAP disparaît en coexpression avec CG31012 (EP(3)3700) (C) ou la GMPc kinase (UY3121) (D).

F-H : augmentation du phénotype associé à ExoSGAP

E-F dérégulation de *CG7097*. E : GMR-Gal4/EP(2)2445 l'œil est faiblement rugueux. F : coexpression avec ExoSGAP GMR-Gal4,UAS-ExoSGAP(2 copies)/EP(2)2445. Le phénotype associé à ExoSGAP augmente significativement.

G-H dérégulation de *Yan/ Aop*. G : GMR-Gal4/EP(2)2500 l'œil est légèrement rugueux. H : coexpression avec ExoSGAP GMR-Gal4,UAS-ExoSGAP(2 copies)/EP(2)2500. Le phénotype associé à ExoSGAP augmente.

Photographies prises à la loupe binoculaire Leica MZ FLIII en utilisant une caméra numérique

NB : l'observation à l'œil rend aussi bien compte des différences de phénotypes que les photographies obtenues par microscopie à balayage.

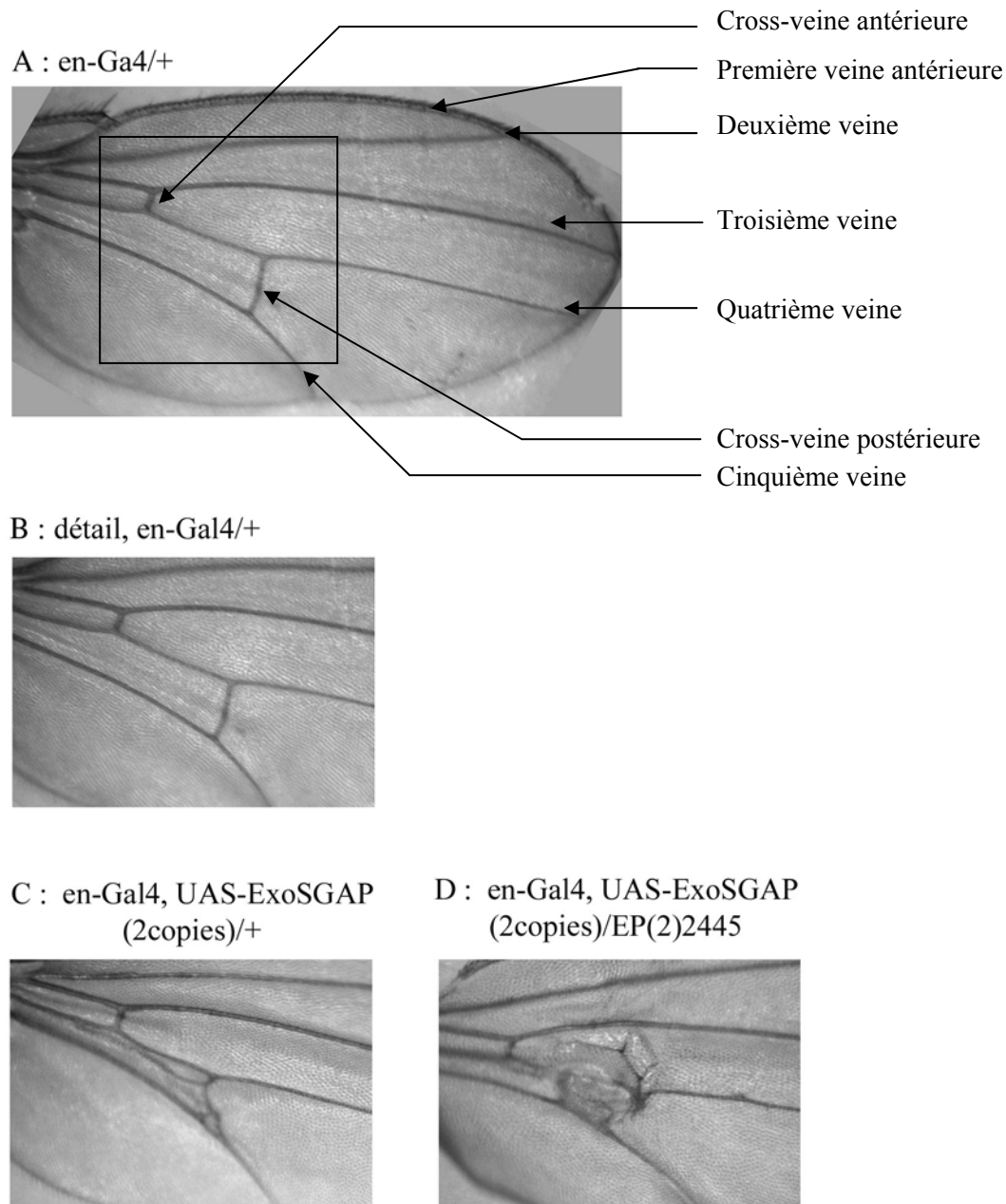


Figure II. 3 : Exemples de quelques gènes candidats modifiant le phénotype lié à l'expression d'ExoSGAP dans l'aile à température ambiante

Partie antérieure en haut, partie proximale à gauche.

A-B : en-Gal4/+ aile contrôle, les veines sont parfaitement organisées. B : détail de l'aile correspondant au rectangle de A

C : en-Gal4,UAS-ExoSGAP(2 copies)/+ des veines surnuméraires apparaissent entre les deux dernières veines postérieures autour de la cross-veine.

D : en-Gal4,UAS-ExoSGAP(2 copies)/EP(2)2445 la dérégulation de *CG7097* augmente fortement le phénotype associé à ExoSGAP, l'aile apparaît déformée autour de la cross-veine postérieure. La dérégulation seule de EP(2)2445 n'a pas d'effet à cette température.

Photographies prises à la loupe binoculaire Leica MZ FLIII en utilisant une caméra numérique.

1. ExoS GAP interfère avec la dynamique du cytosquelette d'actine

Comme attendu, ExoSGAP interagit avec de nombreuses cibles (lignées EP dans le tableau II.1) de RacGAP84C notamment avec des gènes codant des protéines nécessaires à l'intégrité du cytosquelette.

La surexpression de *cdi* (EP(3)3319) supprime partiellement les effets de la toxine dans l'aile et dans l'œil. Ceci suggère que Cdi pourrait agir en aval des GTPases sur une voie ciblée par la toxine. *Cdi* (*center divider*) est une LIM kinase de la famille des Rho-kinases qui correspond à l'homologue humain de la protéine humaine TESK1 (Testis Specific Protein Kinase 1). Les LIM kinases sont impliquées dans le contrôle de la dynamique du cytosquelette d'actine dépendant des Rho GTPases et plus particulièrement de Rac et Cdc42 (Edwards et al., 1999; Ohashi et al., 2000). Cdi permet la phosphorylation et l'inhibition de la cofiline et induit ainsi la stabilisation des filaments d'actine (Yang et al., 1998; Maekawa et al., 1999). En effet, la cofiline en se fixant à la actine polymérisée (F-actine) permet la coupure des filaments d'actine, ces néo-brins peuvent ensuite servir de matrice pour la formation d'un nouveaux filaments ce mécanisme participe à la formation des lamellipodes et pseudopodes. La dépolymérisation permet aussi la libération des monomères d'actine (G-actine) à partir de la F-actine et la dynamique du cytosquelette d'actine qui est très importante dans la phagocytose (Bierne et al., 2001). La toxine ExoSGAP perturberait donc cette dynamique cellulaire nécessaire au fonctionnement de la cellule.

Parallèlement ExoSGAP interagit avec d'autres éléments du cytosquelette d'actine. Notamment, la surexpression de la myosine *Myo31D* (EP(2)2491) augmente les effets de la toxine. *Myo31DF* est une protéine myosine de classe I qui peut se fixer au filament d'actine. Les myosines I possèdent une activité ATPase et sont des moteurs moléculaires impliqués dans le transport de protéines et de vésicules le long des filaments d'actine. Dans les hémocytes, la surexpression de Ras conduit à la surprolifération des hémocytes et active notamment l'expression de *Myo31DF* et d'une *RacGAP* (CG13345) (Asha et al., 2003).

Les effets d'ExoSGAP sur la phagocytose pourraient s'expliquer directement par un effet sur la régulation de la dynamique (polymérisation/dépolymérisation) de l'actine perturbant aussi bien la phagocytose que le transport vésiculaire, cette activité pouvant dépendre de Cdi et *Myo31DF* respectivement.

2. ExoSGAP interagit avec les voies de signalisation dépendantes des MAPK et JNK.

a. Interaction génétique avec la voie des MAPK

MESR4 et MESR2 sont deux protéines dont la surexpression supprime les effets de l'activation constitutive de Ras (Huang et al., 2005).

Mesr4 (EP(3)386) est un suppresseur de l'effet d'ExoSGAP dans l'aile alors que son effet est moins significatif dans l'œil. Au contraire, *Mesr2* (EP(2)2404, EP(2)2072) augmente le phénotype de départ associé à ExoSGAP. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec RacGAP84C (Raymond et al., 2004). Ils sont aussi en accord avec des résultats antérieurs qui montrent un dialogue entre les voies dépendantes des Ras GTPases et des Rho GTPases (Raymond et al., 2004). Des expériences de RNAi ont montré que MESR4 aurait un rôle de le maintien à l'état inactif de la synthèse de peptides antimicrobiens dépendante de la voie Imd en absence d'infection. Par ailleurs, les cellules traitées aux dsRNA contre *Mesr4* apparaissent plus grosses, moins rondes, les réseaux de tubulines et d'actines sont aussi perturbés (Foley et O'Farrell, 2004). ExoSGAP pourrait ainsi interférer sur les voies contrôlées par MESR4 et agissant sur le cytosquelette d'actine.

La coexpression d'ExoSGAP et CG31012 (EP(3)3700) supprime totalement le phénotype d'ExoSGAP dans l'œil (Fig II.2 C) au contraire de ce qui avait été observé avec RacGAP84C. Ceci suggère que CG31012 contrecarre les effets d'ExoSGAP et agit comme un effecteur des Rho GTPases ciblées par cette toxine dont la surexpression corrige partiellement les effets inhibiteurs de la toxine ExoSGAP.

b. Interaction génétique avec la voie des JNK

Bien que l'expression ubiquiste d'ExoSGAP n'ait pas d'effet observable sur l'activation des gènes cibles de la voie des JNK après infection (voir résultats chapitre I), son effet ne peut être exclu. Le niveau d'expression pourrait ne pas être suffisant pour affecter significativement le fonctionnement de cette voie au cours de la réponse immunitaire. Plusieurs données génétiques que nous avons obtenues sont en effet en faveur de l'existence de cette interaction.

La surexpression seule d'AOP (EP(2)2500) induit des défauts de morphogenèse de l'œil (Fig. II.2 G) ou de l'aile à 25°C, ce phénotype est réduit à température ambiante (non

montré). L'augmentation dans l'œil du phénotype associé à ExoSGAP en interaction avec AOP est suffisamment fort à 25°C et à température ambiante pour suggérer un effet synergique entre les deux protéines (Fig. II.2 H). AOP, inhibé par la JNK (Basket), est une protéine inhibant la transcription des gènes cibles du complexe DJun/DFos (Noselli et Agnes, 1999). En cellules S2, l'inhibition d'AOP par ARN interférence diminue la synthèse des peptides antimicrobiens (Kallio et al., 2005). L'effet phénotypique observé au niveau de l'œil pourrait refléter l'existence d'une synergie d'action d'AOP et d'ExoSGAP sur l'inhibition de la voie des JNK.

Le phénotype associé à ExoSGAP est augmenté par la dérégulation du gène CG7097 (EP(2)2445) (Fig. II.2 F pour l'œil) à 25°C et à température ambiante (Fig. I.3 D pour l'aile). Cet effet dans l'œil a été confirmé à température ambiante : l'insertion EP n'a pas d'effet phénotypique à cette température avec GMR-Gal4 seul, tandis qu'en coexpression avec ExoSGAP, on observe une augmentation des effets associés à l'expression de la toxine. CG7097 code une Sérine/thréonine kinase, très similaire à la MAPKKKK 3 (MAP4 K 3) ou GLK « **G**erminal center kinase **r**e**L**ated protein **K**inase ». Cette protéine est impliquée chez les mammifères dans la régulation des voies JNK (Diener et al., 1997), il est probable que le produit du gène CG7097 ait des fonctions similaires chez la drosophile. En cellules S2, l'inhibition de CG7097 par RNAi diminue la synthèse des peptides antimicrobiens, aucun élément ne permet de dire si cet effet est direct sur les voies NF- κ B ou s'il dépend de la voie des JNK (Kallio et al., 2005). Ces résultats sont à nouveau en faveur d'un contrôle de la voie de JNK par ExoSGAP.

L'ensemble des résultats montre une interférence d'ExoSGAP avec les voies impliquant les JNK visibles dans l'aile ou dans l'œil. Ces voies peuvent être impliquées dans la réponse immunitaire chez la drosophile. Elles peuvent avoir un effet direct, en activant l'expression de nombreux gènes de réponse aux infections après infection dans le corps gras (Boutros et al., 2002; Silverman et al., 2003; Park et al., 2004b). Le rôle de la voie des JNK pourrait aussi être plus indirect en contrôlant la prolifération des hémocytes, la surexpression d'AOP ou de Rac1 induit une sur-prolifération des hémocytes chez la larve (Zettervall et al., 2004). Le rôle de AOP et CG7097 dans la réponse immunitaire reste à approfondir.

3. Interaction d'ExoSGAP avec *domino*

domino code un facteur du réarrangement de la chromatine, ce gène est nécessaire à la prolifération des hémocytes : les larves mutantes pour ce gène sont dépourvues de cellules sanguines (Braun et al., 1998). Le remodelage de la chromatine assure l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription. L'insertion de l'élément P à proximité du début du transcrit de *domino* (EP(3)2371) augmente les effets de la toxine dans l'œil. L'exoenzyme S pourrait agir dans des processus contrôlés par Domino. Certaines données de la littérature montrent que l'activité des voies des Ras/MAPK dépendent des facteurs de remodelage de la chromatine pour le contrôle des gènes cibles (Therrien et al., 2000; Raymond et al., 2004). L'interaction entre Domino et ExoSGAP pourrait être une conséquence d'un effet d'ExoSGAP sur la voie des Ras/MAPK ou des voies des JNK pour le contrôle de gènes cibles, ce qui reste à déterminer.

4. Interactions entre ExoSGAP et des éléments de la réponse immunitaire cellulaire et humorale

a. Effet d'ExoSGAP sur les éléments de la voie Imd

La surexpression de *imd* (UAS-*imd*) contrecarre les effets de la toxine dans l'aile mais n'a pas d'effet dans l'œil. Imd active à la fois Relish et la voie des JNK par l'intermédiaire de TAK1 suite à une infection (Silverman et al., 2003). Ce résultat est encore en faveur d'un effet inhibiteur d'ExoSGAP sur la voie des JNK.

ExoSGAP interagit avec une mutation de *dredd* (*dredd^{btl}*), un homologue de la caspase-8, situé en aval de IMD (Georgel et al., 2001; Leulier et al., 2000). La perte d'une dose génique de *dredd* diminue les effets associés à ExoSGAP, suggérant qu'ExoSGAP conduit indirectement à une activation d'une voie des caspases. Il semble y avoir une synergie d'action entre DREDD et la toxine soit pour l'induction de l'apoptose soit dans le contrôle de voies non-apoptotiques, ce qui reste à déterminer (voir aussi la partie sur l'apoptose) .

Plusieurs éléments sont donc en faveur d'un rôle d'ExoSGAP dans la réponse humorale et notamment la voie Imd, bien qu'aucun effet n'ait pu être mis en évidence après infection. Il pourrait y avoir des compensations entre les Rho GTPases suffisantes pour avoir

une réponse immunitaire normale. La recherche de partenaires génétiques d'ExoSGAP dans l'œil permet de voir des effets plus fins de la toxine sur la signalisation endogène, mais ne permet pas d'avoir la certitude que ces interactions existent aussi au cours de la réponse immunitaire.

b. Effet d'ExoSGAP sur les éléments de la voie Toll

La surexpression de *cactus* (I- κ B) (UY1363), l'inhibiteur des facteurs NF- κ B Dif et Dorsal, compense partiellement les effets morphogénétiques associés à l'expression de la toxine dans l'œil, ce qui suggère qu'une cible d'ExoSGAP puisse être impliquée directement ou non dans l'activation de la voie Toll.

Chez les mammifères, l'exoenzyme S lorsqu'elle est présente dans le milieu extracellulaire active les voies des TLRs dans les monocytes en favorisant le couplage entre les TLR2 et TLR4/MD-2/CD14, ExoS agit sur le TLR2 par sa partie C-terminale et sur le TLR4 par sa partie N-terminale qui possède le domaine GAP (N-ter). Cet effet serait le résultat d'une interaction d'ExoS avec la partie extracellulaire des TLRs (Epelman et al., 2004). Le résultat que nous avons obtenu suggère un effet similaire de la toxine lorsqu'elle est présente dans le cytoplasme de la cellule hôte.

Par ailleurs, il a été montré que les Rho GTPases peuvent intervenir dans le contrôle et l'activation des voies TLRs des mammifères. La stimulation du TLR2 grâce au recrutement de Rac1 et de la PI3K dans des lignées humaines de monocytes (THP-1) induit l'activation de NF- κ B (Arbibe et al., 2000). La production des cytokines dépendante du TLR4 et TLR2 en réponse au LPS dépend de RhoA (Chen et al., 2002; Teusch et al., 2004). Jusqu'à présent aucune implication des Rho GTPases dans la voie Toll n'a été montrée chez la drosophile, mais elle n'est pas exclue. Ainsi, l'effet observé avec ExoSGAP sur la voie Toll pourrait soit dépendre d'une interaction protéine-protéine avec un élément de la voie Toll, soit d'un effet dépendant des Rho GTPases et indirectement sur l'activation de la voie Toll. Dans cette seconde hypothèse, le domaine GAP devrait avoir une activité effectrice en aval d'une Rho GTPase, ce qui a été décrite dans la littérature (Jullien-Flores et al., 1995) mais est en contradiction avec les effets observés dans l'œil lors de la coexpression d'ExoSGAP avec les différentes GTPases. La première hypothèse semble la plus favorable.

Nous avons montré qu'ExoSGAP interagit génétiquement avec d'autres éléments de la voie Toll : le phénotype lié à la toxine est légèrement augmenté dans l'œil par l'insertion d'un

élément P en 5' du gène *Traf2*, ExoSGAP pourrait donc agir en synergie avec Traf2 dans l'activation de la voie Toll ce qui serait en faveur de la première hypothèse sur le rôle d'ExoSGAP dans cette voie. En cellules S2, Traf2 interagit avec Pelle pour l'activation du facteur de transcription Dorsal (Shen et al., 2001). Chez la larve de drosophile, la surexpression de *Traf2* induit la synthèse des peptides antimicrobiens à travers l'activation de Dif et Relish (voie Toll et IMD respectivement) alors que la mutation de *Traf2* ne permet pas l'activation de l'expression des peptides antimicrobiens chez les larves infectées par *E. coli* (Cha et al., 2003). Le croisement des individus mutants pour *Traf2* avec la lignée exprimant ExoSGAP ne modifie pas, dans la descendance, le phénotype associé à ExoSGAP. Traf2 pourrait donc se situer en aval d'ExoSGAP ou être une cible directe d'ExoSGAP. Une autre alternative serait que la perte d'une seule copie n'est pas suffisante pour supprimer la phénotype de la toxine, comme c'est la plupart du temps le cas.

La surexpression d'ExoSGAP avec Traf1 (EP(2)578) supprime les effets d'ExoSGAP dans l'aile. Traf1 a donc un effet opposé à Traf2 sur le phénotype d'ExoSGAP. Différentes données de la littérature ont montré une régulation de la voie des JNK par Traf1 (Liu et al., 1999; Cha et al., 2003), notamment pour le contrôle de l'apoptose (Kuranaga et al., 2002). Comme la voie des JNK peut être contrôlée par les Rho GTPases, l'expression d'ExoSGAP en inhibant cette activité pourrait donc contrecarrer les effets liés à la surexpression de *Traf1* dans l'aile.

c. Interaction d'ExoSGAP avec la GMPc kinase

Le phénotype induit par ExoSGAP est partiellement supprimé par l'insertion UY3121 qui interrompt potentiellement deux des neuf transcrits du gène codant la GMPc kinase ou protéine kinase GMPc dépendante (PKG) (foraging UY3121) (Fig. I.12 J). La GMPc kinase est une enzyme qui peut être activée indirectement par le signal nitrique qui sert de signal secondaire pro-inflammatoire au cours d'une infection (Blaise et al., 2005). Chez la drosophile suite à une infection naturelle, il y a activation de la NOS (**NO** synthase) de l'épithélium intestinal permettant la synthèse du NO. Dans ces conditions, le NO participe à l'activation de la synthèse des peptides antimicrobiens par le corps gras, probablement par l'intermédiaire des hémocytes (Nappi et al., 2000; Foley et O'Farrell, 2003). On peut donc supposer qu'un des rôles du NO serait de participer à l'activation de la GMPc kinase. Des expériences sur des

cellules en culture de la lignée HEK-293, ont mis en évidence le rôle du NO et de la GMPc kinase dans l'activation de la voie des p38MAPK. Cette activation dépend de la stimulation de Rac1 par la GMPc kinase (Hou et al., 2004). ExoSGAP pourrait aussi agir à ce niveau de régulation par l'intermédiaire de Rac1 et/ ou Rac2. L'effet d'ExoSGAP pourrait être compensé par une surexpression de la GMPc kinase, un activateur des protéines Rac.

d. Interaction avec des protéines à domaines LITAF

L'insertion d'un élément P à proximité de deux gènes contenant des domaines protéiques ayant des homologies avec LITAF (LPS-induced tumour necrosis factor alpha factor) CG13512 (EP718) et CG30269 (EP(2)2404) diminue les effets associés à l'expression d'ExoSGAP. La protéine de type LITAF chez les mammifères est un facteur de transcription induit par le LPS, il forme un complexe avec STAT6 permettant l'expression de cytokines, dont le TNF α , notamment par les macrophages (Myokai et al., 1999; Tang et al., 2005). Les deux protéines, codées par les gènes CG13512 et CG30269, pourraient avoir un rôle similaire chez la drosophile. Deux gènes codant pour des protéines de type LITAF, CG4250 et CG13559, sont aussi exprimés dans les hémocytes et est induit en réponse à une infection (Irving et al., 2001; Irving et al., 2005). La toxine ExoS pourrait donc perturber la réponse immunitaire par l'intermédiaire des protéines de type LITAF. Le rôle de ces protéines dans la régulation de l'immunité chez la drosophile reste à confirmer.

5. ExoSGAP et les voies de l'apoptose : vers des mécanismes apoptotiques ou non-apoptotiques ?

A ce jour, aucune expérience en culture cellulaire n'a associé la mort cellulaire induite par ExoS comme dépendant du domaine GAP (Kaufman et al., 2000; Jia et al., 2003). Pourtant, certaines interactions génétiques observées laissent penser qu'ExoSGAP pourrait indirectement agir sur des voies de contrôle de l'apoptose. L'insertion d'un élément P à proximité d'un gène pouvant activer les voies apoptiques, *Tms1d* (*Target of methylation induced silencing 1*) (EP(3)807) supprime les effets de la toxine. Son homologue humain ASC/TMS1, possède un domaine de recrutement des caspases (CARD : **C**aspase **R**ecruitment **D**omains) et peut conduire à la mort des cellules par apoptose par l'intermédiaire de la caspase-9 ou de la caspase-8 (McConnell et Vertino, 2000; Masumoto et al., 2003). TMS1

peut aussi avoir des effets non apoptotiques par l'intermédiaire de la caspase-1 inflammatoire ou de la caspase-8 décrite récemment comme pouvant réguler l'activation de NF- κ B dans les lymphocytes (Srinivasula et al., 2002; Hasegawa et al., 2005). ExoSGAP pourrait donc perturber les effets apoptotiques ou non apoptotiques de TMS1d chez la drosophile.

Nous avons observé précédemment un effet probablement synergique d'ExoSGAP et de DREDD. DREDD est l'équivalent chez la drosophile de la caspase-8 dont l'activation peut conduire à l'apoptose (Chen et al., 1998). De plus, la voie Imd qui implique Dredd, déclenche soit la production de peptides anti-microbiens soit la mort cellulaire programmée (Leulier et al., 2000; Georgel et al., 2001). L'interaction entre DREDD et ExoSGAP pourrait ainsi agir sur les effets non apoptotiques de la caspase DREDD, c'est-à-dire sur l'activation de Relish ou sur les voies proapoptotiques impliquant cette caspase.

ExoSGAP pourrait agir différemment sur les voies de contrôle des caspases soit pour le contrôle de l'apoptose soit pour le contrôle de processus non apoptotiques, l'effet exact de la toxine sur ces voies reste à déterminer.

- La voie des JNK qui paraît être une cible de la toxine peut aussi conduire à la mort cellulaire par apoptose par l'intermédiaire de la caspase-9 (DRONC), cette dernière pouvant avoir des effets anti-apoptotiques (Hay et al., 2004).
- DREDD (caspase-8) conduit aussi bien à l'activation de la mort cellulaire qu'à l'activation de NF- κ B (Chen et al., 1998; Georgel et al., 2001).
- TMS1 chez les mammifères interagit avec diverses caspases soit dans la régulation de l'apoptose soit dans l'activation d'autres mécanismes non-apoptotiques au cours de la réponse inflammatoire (Srinivasula et al., 2002; Masumoto et al., 2003).

Des études complémentaires seraient nécessaires pour déterminer plus précisément les effets de la toxine en étudiant notamment les interactions avec d'autres protéines contrôlant la mort cellulaire, Dronc (caspase-9), des activateurs de l'apoptose Reaper, Hid et Grim (Hay et al., 2004)... Il serait aussi possible de regarder l'effet de la surexpression de *dredd* sur le phénotype associé à ExoSGAP.

IV. Conclusion

Cette étude a abouti à l'identification de voies de signalisation affectées par l'expression d'ExoSGAP. Chez les mammifères les toxines de type III perturbent particulièrement la réponse immunitaire et il est manifeste que les gènes candidats sont également impliqués dans la réponse immunitaire (Fig. II.4).

- ExoSGAP pourrait affecter la réponse immunitaire cellulaire en agissant sur la dynamique du cytosquelette d'actine.
- Bien qu'aucun effet sur la synthèse des peptides antimicrobiens n'ai été mis en évidence, ExoSGAP interfère avec différents éléments régulateurs des voies Toll et Imd suggérant un rôle des RhoGTPases dans la régulation de ces voies.
- ExoSGAP semble cibler plus particulièrement les voies des JNK qui sont au cœur de nombreux processus dans la cellule notamment pour la régulation de la réponse inflammatoire et l'apoptose.
- Étonnamment, ExoSGAP interagit différemment sur des éléments de contrôle de l'apoptose synergique avec DREDD et son phénotype est supprimée par la surexpression de TMSD1 suggérant un rôle différentiel d'ExoSGAP sur les voies des caspases.

Du fait de la conservation des voies de signalisation entre la drosophile et les mammifères, les gènes que nous avons identifiés sont probablement des cibles d'ExoSGAP dans les organismes supérieurs, dont certains sont connus comme ayant un rôle dans la réponse immunitaire (TLRs, JNK, TNF). Ces résultats ouvrent la voie vers l'identification de nouveaux mécanismes immunitaires affectés par une toxine de type III.

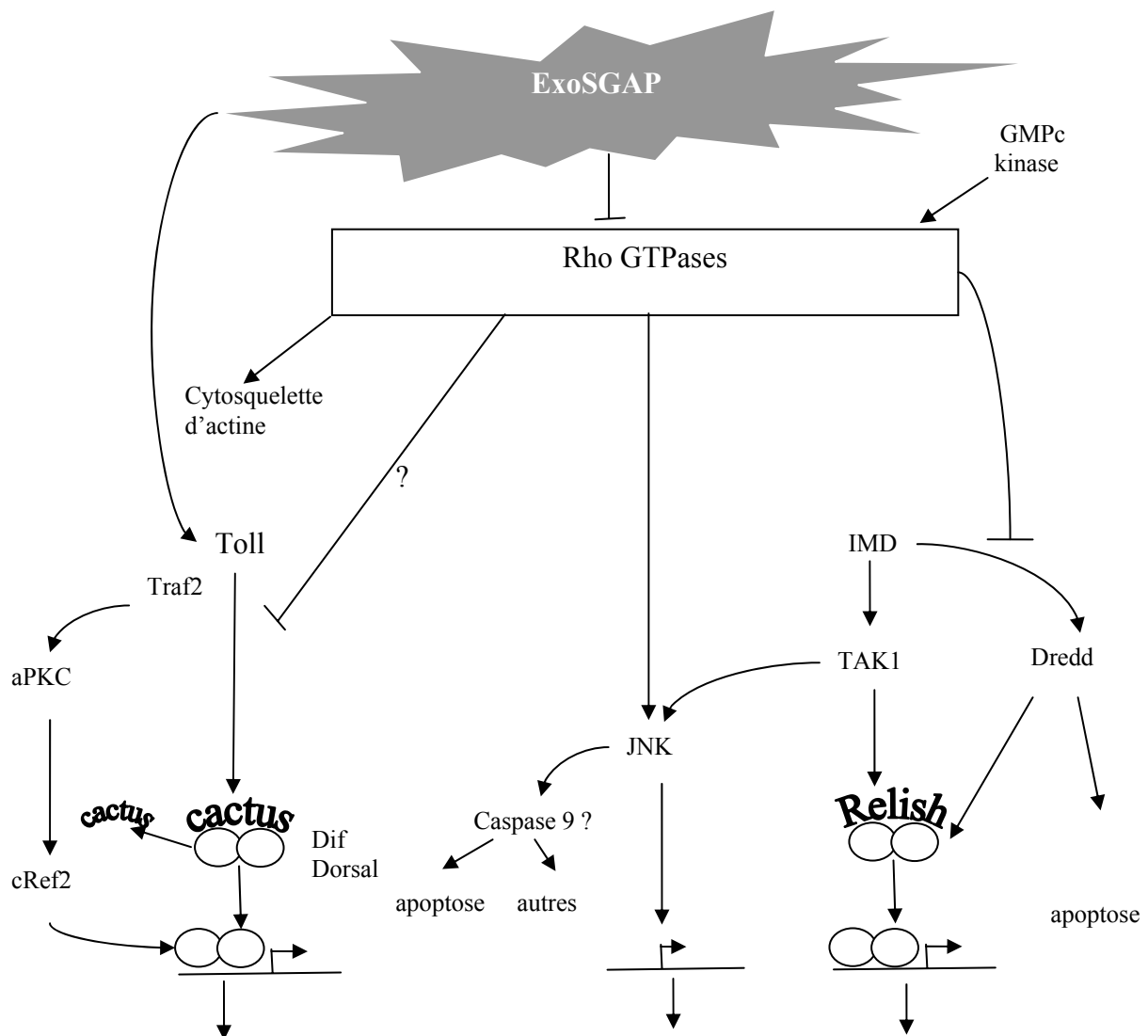


Figure II. 4 : Modèle simplifié des interactions possibles d'ExoSGAP avec les voies de signalisation de la drosophile (non exhaustif)

La limite de ce type de crible est que les effets observés dans l'œil ou dans l'aile ne sont pas nécessairement transposables à d'autres mécanismes cellulaires, les effets observés pourraient en réalité être différents dans d'autres organes. C'est pourquoi, certains des gènes candidats vont être maintenant étudiés pour leur implication dans la réponse immunitaire, en recherchant notamment dans quel type d'organe ils sont nécessaires et dans quels processus ils interviennent, la toxine pouvant avoir des effets différents en fonction du type cellulaire analysé.

Nous avons validé la drosophile comme modèle d'étude des toxines bactériennes intracellulaire. La construction de lignées transgéniques permet d'étudier les effets de ces

toxines indépendamment de la bactérie sur un organisme. L'utilisation du système UAS-GaL4 permet d'exprimer l'exoenzyme dans n'importe quel tissu de la mouche et ainsi de déterminer les organes et fonctions cellulaires ciblés. L'obtention d'un phénotype externe visible dans des organes non vitaux comme l'œil ou l'aile peut servir de point de départ pour un crible par mutagenèse de la drosophile afin de déterminer les voies de signalisation affectées par la toxine et transposer ensuite les résultats obtenus aux cellules de mammifères.

Ce système est adaptable à n'importe quelle toxine de type III et peut permettre la caractérisation de toxines de fonction peu ou non connue. Nous avons décidé d'étudier la fonction d'ExoU dont l'activité de phospholipase a été découverte récemment (Sato et Frank, 2004), en recherchant par mutagenèse soit de dérégulation soit par mutagenèse à l'EMS (**E**thyl **M**ethyl **S**ulfonate), les voies de signalisation ciblées par cette toxine.

RESULTATS
CHAPITRE 3

SPECIFICITE DE RAC2
DANS LA REPONSE IMMUNITAIRE
DE LA DROSOPHILE

I. Introduction

Les Rho GTPases sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires, elles ont un rôle majeur dans le déroulement de la réponse immunitaire innée ou acquise chez les mammifères. Il existe chez la drosophile, trois protéines de type Rac (Rac1, Rac2 et Mtl), une protéine Rho1 et une protéine RhoL n'ayant pas d'homologue chez les mammifères, ainsi qu'une protéine Cdc42 et une protéine RhoBTB. Peu de choses sont connues sur l'implication des Rho GTPases dans les éléments nécessaires à la réponse immunitaire chez la drosophile.

Rac2 est exprimé dans les hémocytes (Irving et al., 2005) et est induit après infection ou stress oxydant (Boutros et al., 2002; Girardot et al., 2004). Des expériences en cellules S2 de RNAi contre *Rac2* ont montré une induction deux fois plus forte du gène rapporteur dipt-lacZ, après stimulation par le LPS. Rac2 pourrait agir comme un répresseur de la synthèse des peptides antimicrobiens (Foley et O'Farrell, 2004).

Ainsi, la Rho GTPase que l'on retrouve le plus souvent exprimée dans les organes de la réponse immunitaire avec ou en absence d'infection est Rac2, ce qui suggère un rôle spécifique de cette GTPase dans la réponse au stress infectieux.

Le rôle des GTPases dans la réponse immunitaire a été essentiellement étudié chez les mammifères (Bokoch, 2005), la spécificité et l'importance de chacune des Rho GTPases dans cette réponse ne sont pas encore complètement connues. Au laboratoire, suite aux résultats obtenus avec ExoSGAP, qui cible les quatre Rho GTPases, Rho, Rac1, Rac2 et Cdc42, suggérant un rôle de ces protéines dans la réponse immunitaire cellulaire chez la drosophile, nous avons décidé de définir plus précisément le rôle, l'importance et la fonction des différentes Rho GTPases dans la réponse immunitaire *in vivo*.

II. Résultats

1. Un mutant *Rac2^A* est spécifiquement sensible aux infections bactériennes

a. Sensibilité des mutants des Rho GTPases aux infections par *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1 et PAO non cytotoxique)

Dans un premier temps, nous avons testé la résistance aux infections des différents mutants de Rho GTPases (exceptés RhoL et RhoBTB) par piqûre septique de drosophiles adultes par les souches de *P. aeruginosa*, PAO1 et PAO non cytotoxique (PAOnc). PAO1 correspond à la souche de référence de *P. aeruginosa* dont le génome est complètement séquencé. La souche PAO non cytotoxique est moins virulente, peu de choses sont connues sur les mécanismes de virulence déficients dans cette souche, en dehors du fait que le système de sécrétion de type III n'est pas fonctionnel (Dr Ina Attrée, communication personnelle). Pour les infections par *P. aeruginosa*, nous utilisons les mêmes conditions que précédemment.

Exceptés les mutants *Rac2^A* et *mtl^A*, tous les mutants amorphes de Rho et cdc42 sont létaux à l'état homozygote. Dans le cas de la mutation *Rac1^{J11}*, considérée comme viable, (Hakeda-Suzuki et al., 2002), nous observons un nombre limité d'adultes homozygotes survivants, ils ont donc été testés en hétérozygotes ou face à une mutation hypomorphe *Rac1^{J10}* (voir Tab. III.1); la souche w¹¹¹⁸ a servi de témoin. Aucune des combinaisons testées n'a permis de mettre en évidence un phénotype clair de sensibilité aux infections, exceptés pour *Rac2^A*.

Seul le mutant *Rac2^A* a montré une augmentation importante de sa sensibilité par rapport aux témoins hétérozygotes *Rac2^A/+* lors d'infections par PAO1 et PAOnc (Fig. III.1 A pour PAOnc, non montré pour PAO1). Rac2 a donc un rôle dans la résistance aux infections par *P. aeruginosa*.

Tableau III. 1 : Sensibilité des mutants des Rho GTPases aux infections

Rho GTPases	chromosome	mutation	Type de mutation et viabilité	Combinaisons testées	Sensibilité aux infections par piqure septique par PAO
Rho1	Chromosome II	<i>Rho¹</i> <i>Rho^{72R}</i> élément P (Strutt et al., 1997)	Amorphe : létal Amorphe : létal	<i>Rho^{1/+}</i> <i>Rho^{72R/+}</i>	Pas de sensibilité reproductible Pas de sensibilité reproductible
RhoL (Rho-like)	Chromosome III		Amorphe : létal		ND
<i>Rac1</i>	Chromosome III	<i>yw</i> ; <i>Rac1¹¹</i> , <i>FRT2A/TM6,β</i> (Hakeda-Suzuki et al., 2002; Ng et al., 2002)	Amorphe : quasi-létal	<i>Rac1^{11/+}</i>	Pas de sensibilité reproductible
		<i>Rac1¹¹⁰</i> (Hakeda-Suzuki et al., 2002; Ng et al., 2002)	Hypomorphe : viable	<i>Rac1¹¹¹/ Rac1¹¹⁰</i>	Pas de sensibilité reproductible
				<i>Rac1J10/ rac1¹¹⁰</i>	Pas de sensibilité reproductible
<i>Rac2</i>	Chromosome III	<i>Rac2^A,ry⁵⁰⁶</i> (Hakeda-Suzuki et al., 2002; Ng et al., 2002)	Amorphe viable	<i>Rac2^A,ry⁵⁰⁶</i>	Sensible
<i>Mtl</i> (<i>mig 2 like</i>)	Chromosome III	<i>yw</i> ; <i>mtl^A</i> , <i>FRT2A</i> (Hakeda-Suzuki et al., 2002; Ng et al., 2002)	Amorphe, semi-viable	<i>yw</i> ; <i>mtl^A</i> , <i>FRT2A</i>	Pas de sensibilité reproductible
<i>cdc42</i>	chromosome X	<i>yw,cdc42²</i> (Fehon et al., 1997)	Hypomorphe viable	<i>cdc42^{2/+}</i>	Pas de sensibilité reproductible
		<i>yw,cdc42⁴</i> (Fehon et al., 1997)	Amorphe : létal	<i>cdc42²/ cdc42⁴</i> <i>cdc42⁴/ cdc42⁴</i>	Pas de sensibilité reproductible Pas de sensibilité reproductible
		EP3099 insertion élément P en 5' (premier exon)			
<i>RhoBTB</i>	Chromosome III		létal		ND

Dans le cas du mutant *mtl*^Δ, les individus homozygotes ont pu être testés pour leur résistance aux infections. Néanmoins la souche doit être conservée à l'état hétérozygote sur un chromosome balancier et les mutants *mtl*^Δ présentent un fort retard de développement. Ceci suggère que Mtl est nécessaire au développement normal de la mouche.

Bien qu'un effet n'ait été observé qu'avec la mutation *Rac2*^Δ, l'implication des autres Rho GTPases dans la résistance aux infections ne peut pas être exclue, puisque seules des pertes partielles de fonction ont été testées, ce qui n'est peut-être pas suffisant pour avoir un effet sur la sensibilité. Une approche de RNAi *in vivo* permettrait d'avoir une inhibition des différentes Rho GTPases et permettrait ainsi d'étudier leur rôle dans les différents organes de la réponse immunitaire afin de tester leur contribution à la survie des drosophiles en cas d'infection par différents pathogènes.

Le mutant *Rac2*^Δ est complètement viable à l'état homozygote et il ne présente aucun phénotype externe visible. J'ai constaté cependant un très léger retard du développement. Dans la littérature, peu de résultats montrent un rôle spécifique de Rac2. Par exemple, des expériences de surexpression de *Rac2* avec la lignée EP(3)3118 montrent une implication de Rac2 dans la spécification des cellules cardiaques au cours du développement (Bidet et al., 2003). La plupart du temps, les seuls effets de Rac2 sur le développement ont été observés en combinaison avec Rac1 et / ou Mtl (Hakeda-Suzuki et al., 2002; Ng et al., 2002), suggérant qu'il existe une redondance fonctionnelle entre les GTPases. Le fait que seul le mutant *Rac2*^Δ soit parfaitement viable est en faveur d'un rôle de Rac2 tardif dans la vie adulte, alors que les autres Rho GTPases auraient un rôle plus précoce et essentiel dans le développement. Ainsi, nous avons ensuite décidé de poursuivre la caractérisation de la fonction Rac2 dans la réponse immunitaire

b. La contribution de Rac2 dans la résistance aux stress infectieux n'est pas spécifique du type bactérien

Le mutant *Rac2*^Δ a été infecté par différentes souches bactériennes aussi bien à Gram négatif qu'à Gram positif. Le mutant *Rac2*^Δ présente une sensibilité aux bactéries à Gram négatif *A. tumefaciens* (Fig. III.1 B) et *E. cloacae* (Fig. III.1 C) par rapport aux témoins (*Rac2*^{Δ/+}). Le mutant présente aussi une cinétique de mortalité accélérée lorsque les drosophiles sont infectées par des bactéries à Gram positif, *S. aureus* (Fig. III.2 A), *E. faecalis* (Fig. III.2 B).

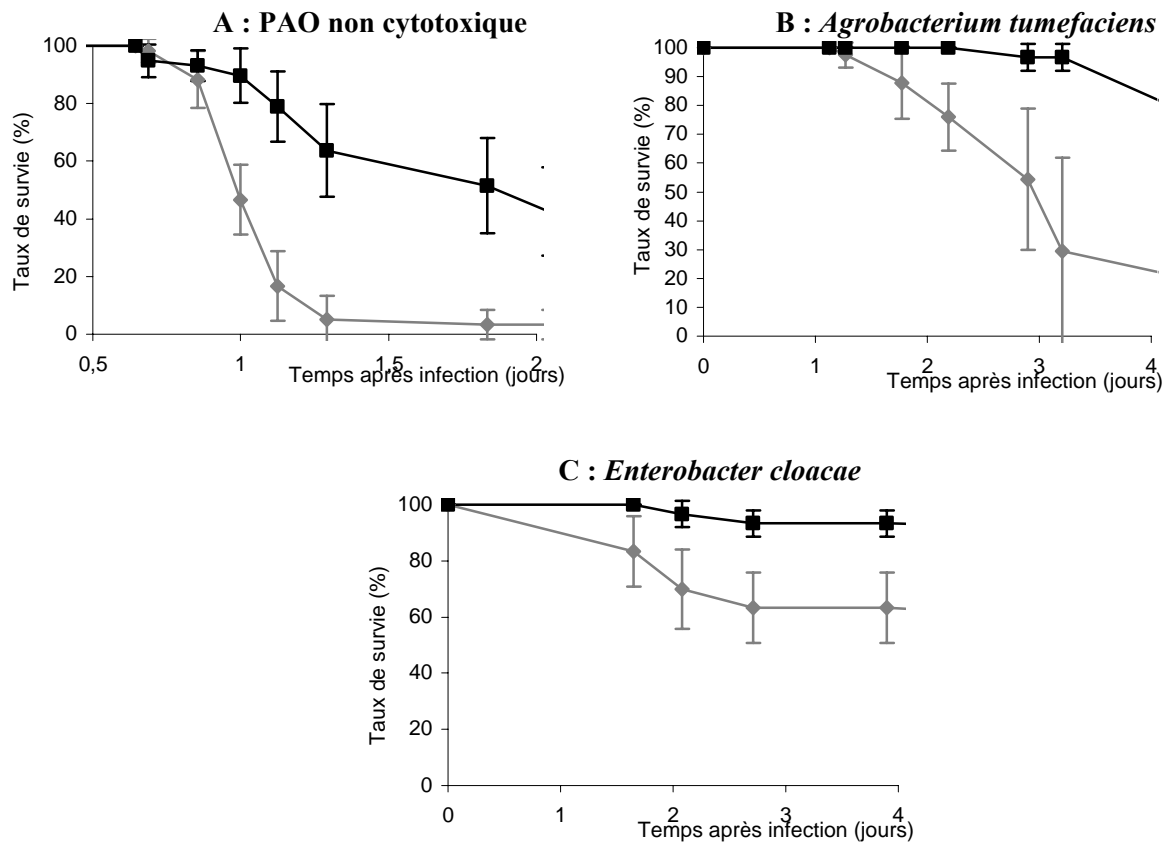


Figure III. 1 : Sensibilité des mutants *Rac2*^Δ aux infections par piqûre septique par différentes souches bactériennes à Gram négatif

Survie d'individus de même sexe, âgés de 7-9 jours aux infections par différentes souches bactériennes.

B : infection par *P. aeruginosa* (souche PAO1 non cytotoxique), culture de 3h diluée à une DO_{600nm} de 0,4-0,5 (P<0,001).

Infection à l'aide d'un culot d'une culture de 50 ml en phase stationnaire de *A. tumefaciens* (B) (P<0,001) et de *E. cloacae* (C) (P<0,001).

Les mutants *Rac2*^Δ (en gris) sont plus sensibles aux infections par des différentes souches de bactéries à Gram négatif que les hétérozygotes *Rac2*^Δ /+ (en noir).

En conclusion, le mutant *Rac2*^Δ est aussi sensible aux infections par des bactéries à Gram négatif que positif, prouvant que Rac2 intervient dans des processus généraux de la résistance aux pathogènes et non dans des mécanismes de reconnaissance spécifique.

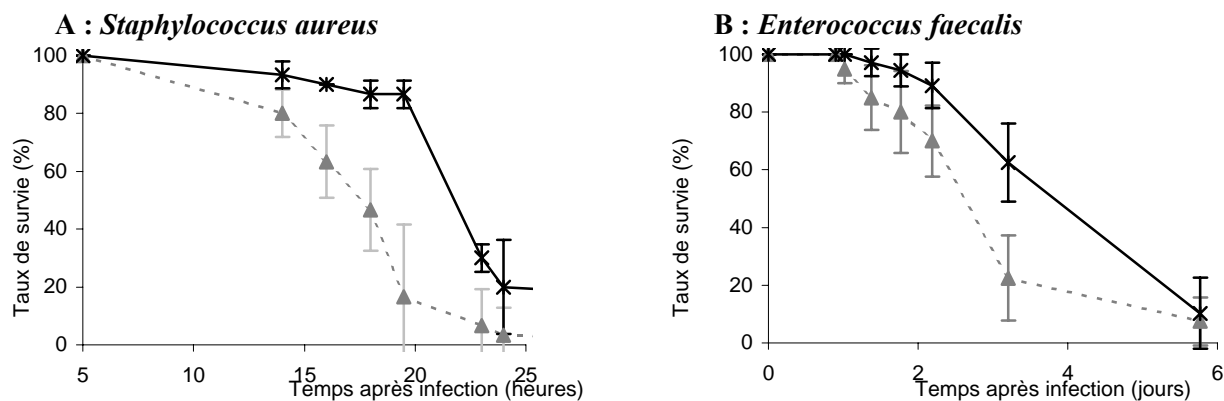


Figure III. 2 : Sensibilité des mutants *Rac2^Δ* aux infections par piqûre septique par différentes souches de bactéries à Gram positif

Survie d'individus de même sexe, âgés de 7-9 jours aux infections par différentes souches bactériennes à partir d'un culot d'une culture de 50ml en phase stationnaire de croissance.

A : infection par *S. aureus* ($P < 0,001$).

B : infection par *Enterococcus faecalis* ($P < 0,03$).

Les mutants *Rac2^Δ* (en pointillé gris) sont plus sensibles aux infections par différentes souches de bactéries à Gram positif que les hétérozygotes *Rac2^{Δ/+}* (en noir).

c. La mutation de *Rac2^Δ* affecte la résistance des mouches aux infections par ingestion de *P. aeruginosa*

Les drosophiles mutantes *Rac2^Δ* ont été placées dans des tubes contenant une solution de sucrose 5% avec bactéries (PAO $DO_{600nm}=0,2$). Là encore, on observe que les mouches *Rac2^Δ* sont plus sensibles aux infections par ingestion de *P. aeruginosa* que les individus hétérozygotes *Rac2^{Δ/+}* (Fig. III.3). Parallèlement, afin de s'assurer que la sensibilité observée est bien due à l'infection et non à un effet lié aux conditions d'élevage, des mouches ont aussi été mises en présence de la solution de sucrose 5% stérile, aucune mouche n'est morte pendant le temps de l'expérience (non montré).

Au cours de ce type d'infection, les hémocytes peuvent avoir un rôle de pivot entre l'épithélium intestinal qui correspond au premier lieu de contact avec les pathogènes et le corps gras, siège de la réponse humorale (Basset et al., 2000; Elrod-Erickson et al., 2000; Foley et O'Farrell, 2003). Les résultats obtenus peuvent suggérer un rôle de Rac2 dans la signalisation ou dans les mécanismes cellulaires liant l'intestin, les hémocytes et le corps gras. Les Rho GTPases sont aussi nécessaires à l'intégrité des épithélia (Braga, 2002), la mutation de Rac2 pourrait perturber la structure de l'épithélium intestinal.

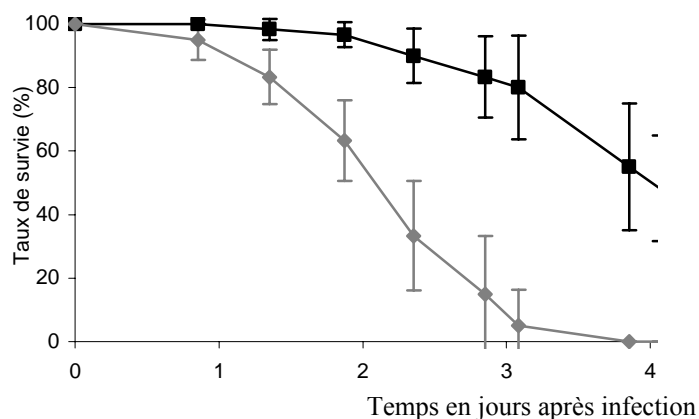


Figure III. 3 : Sensibilité des mutants *Rac2^A* aux infections par ingestion de *P. aeruginosa* (PAO1)

Les mutants *Rac2^A* (en gris) sont plus sensibles aux infections par ingestion que les hétérozygotes *Rac2^A/+* (en noir) ($P < 0,001$).

Pour cela, les bactéries sont diluées à une DO_{600nm} de 0,2 dans du sucrose stérile à 5% et déposées au fond d'un tube d'élevage contenant du papier absorbant. Quinze mouches sont ensuite mises dans ces tubes à raison de trois tubes par génotype.

2. Effet de Rac2 sur l'expression NF- κ B dépendante des peptides antimicrobiens et sur la voie des JNK.

Lors d'une infection par des bactéries, la synthèse NF- κ B dépendante des peptides antimicrobiens est activée rapidement. Il existe aussi une activation précoce de la voie des JNK après infection par des bactéries *in vivo* et en culture cellulaire (Boutros et al., 2002; Park et al., 2004b). Lors d'une infection par des bactéries à Gram négatif, la voie Imd permet une signalisation en direction du facteur de transcription Relish, ainsi qu'une signalisation vers la voie des JNK (Silverman et al., 2003). Le facteur Relish et les JNK régulent l'expression de gènes de la réponse de différents gènes de la réponse immunitaire (Boutros et al., 2002).

Nous avons, avec Evelyne Bergeret, suivi l'induction de gènes cibles des voies Imd, Toll et JNK après infection, par une approche de Northern blot.

a. Infection par des bactéries à Gram négatif : *P. aeruginosa*

Des mouches infectées par PAO1 ont été prélevées une heure, six heures et dix-huit heures après infection. L'ARN est ensuite extrait. Le Northern blot est successivement hybridé par des sondes spécifiques de *puc*, de la *drosomycine*, de l'*actine* qui sert de témoin de charge, puis de la *diptéricine*.

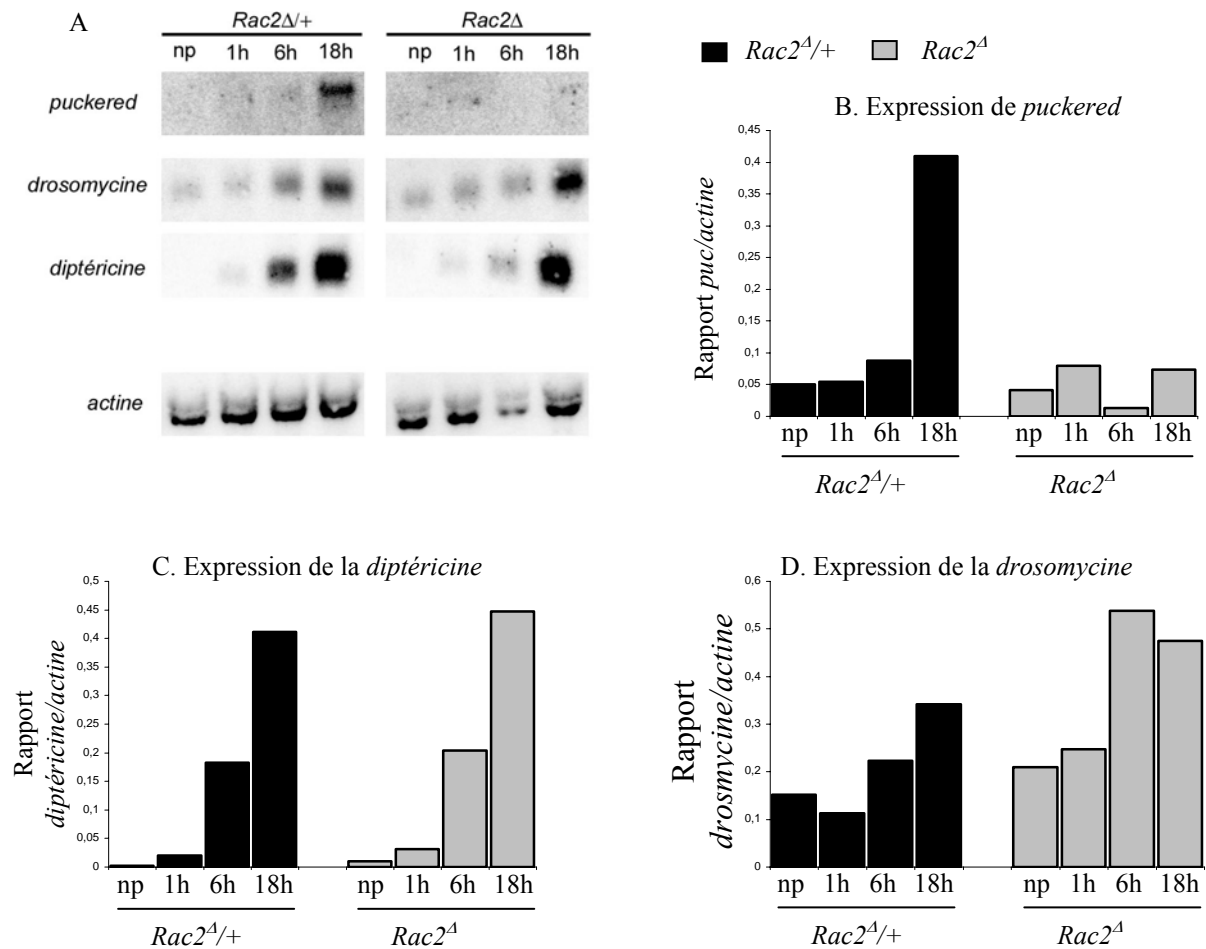


Figure III. 4 : Rac2 participe à l'activation de la voie des JNK et agit comme un contrôle négatif de la drosomycine après infection par la bactérie à Gram négatif PAO1. Mesure de l'induction de *puc*, *diptéricine* et *drosomycine* par Northern blot.

A : résultat du Northern blot. Expression de *puc*, de la *diptéricine* et de la *drosomycine* après infection par PAO1 (culture en phase exponentielle de croissance de 3 heures, diluée à DO_{600nm} de 0,4). B-D Quantification de l'expression de la *diptéricine* (B), *drosomycine* (C) et *puc* (D). L'*actine* sert de témoin interne.

np : mouches non piquées. 1h, 6h, 18h : temps en heures après infection. *Rac2 Δ /+* (en noir), *Rac2 Δ* (en gris).

B. Après infection, l'expression de *puc* est induite à 18 heures chez les contrôles *Rac2 Δ /+*. *puc* n'est jamais induit chez le mutant *Rac2 Δ* .

C. L'expression de la *diptéricine* est induite 6 heures après infection, elle continue à augmenter après 18 heures. La mutation *Rac2 Δ* n'a pas d'effet sur l'activation de la *diptéricine*.

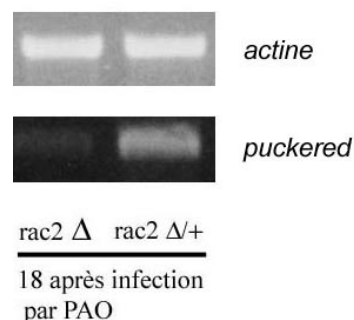
D. Après infection par PAO1, la *drosomycine* est légèrement induite à partir de 6 heures, son expression augmente à 18 heures. Dans le cas du mutant *Rac2 Δ* , l'expression de la *drosomycine* est légèrement plus forte que chez les individus contrôles.

Au cours de l'infection par *P. aeruginosa*, la transcription de *puc* n'est induite que tardivement juste au moment où les premières mouches commencent à mourir (18 heures après infection) chez les individus contrôles *Rac2^{Δ/+}* (Fig. III.4 A, B). Contrairement à ce qui avait été décrit lors d'une infection par *E. cloacae*, nous n'avons pas observé l'activation précoce de la voie des JNK (Boutros et al., 2002; Park et al., 2004b). Le rôle éventuel de Rac2 dans l'activation de la transcription de *puc* à long terme a été confirmé par RT-PCR dans une expérience indépendante (Fig III.5). Il semble que Rac2 participe à l'activation tardive de *puc*, par la voie des JNK au cours d'une infection par *P. aeruginosa*. Rac2 pourrait soit être un activateur de TAK1 qui activerait directement les JNK. Rac2 pourrait aussi agir sur la voie des JNK par l'intermédiaire d'une autre JNKK encore non identifiée.

Cependant l'effet de la mutation *Rac2^Δ* sur l'activation tardive de la voie des JNK, n'a pas été confirmé par la suite (non montré). Nous cherchons actuellement à comprendre les relations exactes qui existent entre Rac2 et la voie des JNK en réponse aux infections par divers pathogènes.

Figure III. 5 : Confirmation par RT-PCR de l'effet de la mutation de *Rac2* sur l'activation de *puckered* 18 heures après infection. L'actine sert de témoin interne, les RT-PCR (one-step RT-PCR kit, BDsciences) sont effectués dans des tubes différents à partir 1 µg d'ARN.

L'expérience de RT-PCR a été effectuée à partir de 1 µg d'ARN (gel agarose 0,8%, TBE 1x) *puc* semble induit dix-huit heures après infection chez les individus témoins mais pas chez le mutant *Rac2^Δ*



Pour confirmer que Rac2 puisse agir comme un régulateur positif de la voie des JNK, nous avons testé l'effet de la surexpression de Rac2 sur la transcription du gène cible *puc* par RT-PCR. Deux expériences indépendantes ont montré que la surexpression de Rac2 induite par choc thermique active la transcription de *puc* (Fig. III.6). Ce résultat confirme que Rac2 peut activer la voie des JNK chez l'adulte.

Les différences sur l'induction à une heure de *puc* observées dans cette étude par rapport aux données de la littérature peuvent s'expliquer par le fait que c'est *P. aeruginosa* qui a été utilisée pour les infections, c'est une bactérie très virulente par rapport à *E. cloacae* et *E. coli*. L'organisme ne réagit peut-être pas de la même manière en fonction du pathogène et de sa virulence, on peut aussi supposer que *P. aeruginosa* est utilisée à une concentration qui permet une activation rapide du système de sécrétion de type III dans l'hôte. Le système de sécrétion de type III affecterait rapidement la réponse immunitaire et peut-être l'activation

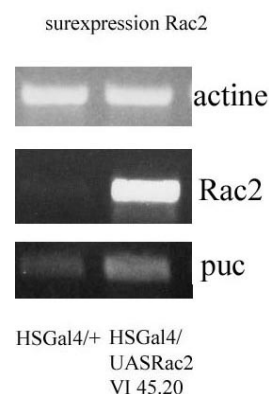
précoce de la voie des JNK. Les infections avec PAO1 se font à plus faible multiplicité d'infection (50-100 bactéries par mouches) par rapport aux infections par d'autres bactéries (utilisation d'une culture en phase exponentielle de croissance diluée contre infection à partir d'un culot d'une culture de bactéries). L'organisme ne se comporterait pas de la même manière en fonction du type bactérien et du nombre de bactéries injectées. Comme l'activation de la voie des JNK peut intervenir très précocement après infection, il aurait aussi fallu mesurer l'activation de cette voie moins d'une heure après infection par piqûre septique. Cette activation transitoire de la voie des JNK pourrait aussi être liée à la cicatrisation dépendante des JNK. Des tests sont en cours pour mesurer l'effet de Rac2 sur l'activation précoce de *puc* en utilisant la bactérie moins virulente *E. cloecae* pour les infections, 30 minutes, 1 heure et 4 heures après infection.

Les inductions très fortes de *puc*, *diptéricine* et *drosomycine* observées chez les contrôles 18 heures après l'infection par *P. aeruginosa*, pourraient correspondre à un emballement des mécanismes de défense face à l'infection qui ne peut être maîtrisée ce qui pourrait expliquer l'activation conjointe des voies NF-κB et JNK.

Figure III. 6 : Effet de la surexpression de *Rac2* sur l'activation de *puc*

L'expérience de RT-PCR a été réalisée à partir de 1 µg d'ARNm extrait à partir d'un pool de 10 mouches (gel agarose 0,8%, TBE 1x).

La surexpression de Rac2 (UAS-Rac2) est induite par l'inducteur HS-Gal4 après un choc thermique de 1 heure à 37°C puis de 1 heure à 17°C, puis 2 heures à 25°C. le choc thermique permet la surexpression de Rac2 (colonne HS-Gal4/UAS-Rac2 comparé à HS-Gal4/+), cette expression ectopique induit la transcription de *puc*.



➤ **L'activation des peptides antimicrobiens chez le mutant *Rac2*^Δ**

- La transcription de la *diptéricine* par le corps gras est activée après infection *P. aeruginosa*, cette activation augmente au cours du temps et elle est très importante 18 heures après infection (Fig. III.4 A, C). La mutation de *Rac2*^Δ n'a donc pas d'effet sur l'activation de la *diptéricine* après infection par *P. aeruginosa* et n'a pas d'effet direct sur l'activation du facteur NF-κB, Relish.

• L'équipe du Dr L. Rhame a démontré que la voie Toll contribue à la résistance aux infections par *P. aeruginosa* et en particulier par la souche PA14 (Lau et al., 2003; Park et al., 2004b; Apidianakis et al., 2005). Nous avons donc aussi mesuré l'induction de la *drosomycine* après infection par *P. aeruginosa* (Fig. III.4 A, D). Nous avons observé que la transcription de la *drosomycine* est induite lors d'une infection par la bactérie à Gram négatif, *P. aeruginosa*. Dans le cas du mutant *Rac2^Δ*, cette induction est légèrement augmentée au cours du temps par rapport au témoin surtout dans les premières heures post-infection (entre une heure et six heures). Rac2 pourrait donc agir dans le mécanisme de rétrocontrôle négatif de la voie Toll par un mécanisme qui reste à déterminer. Rac2 pourrait agir indirectement par l'intermédiaire des JNK ou directement sur un élément d'une nouvelle voie contrôle en direction de la voie Toll. Précédemment, nous avons montré un effet d'ExoSGAP sur la voie Toll : la surexpression de cactus supprimait le phénotype associé à ExoSGAP suggérant un rôle des Rho GTPases dans le contrôle de la voie Toll chez la drosophile. Les intermédiaires moléculaires de ce contrôle restent à déterminer.

b. La réponse immunitaire après infection par *E. faecalis* n'est pas perturbée chez le mutant *Rac2^Δ*

Nous avons regardé de la même manière l'activation des voies de la réponse humorale après infection par la bactérie à Gram positif, *E. faecalis*. Cette bactérie a été préférée à *S. aureus*, car c'est un pathogène moins virulent ce qui induit une cinétique plus lente de mortalité. Ce choix pourrait permettre de mieux appréhender les différences entre le mutant *Rac2^Δ* et le contrôle (Fig. III.7).

Nous avons mesuré l'induction de la *drosomycine* : elle est induite après infection, sa transcription augmente au cours du temps au fur et à mesure que le pathogène se développe dans l'organisme. Comme attendu, la voie Toll est bien activée (Fig. III.7 A, B). L'absence de *Rac2* n'a pas d'effet sur le niveau de la transcription de la *drosomycine*. La voie des JNK n'est pas induite au cours de l'infection par *E. faecalis*, l'expression de *puc* reste à son niveau basal (Fig. III.7 A, C). Une étude ultérieure avait pourtant montré un rôle de la voie Toll dans l'activation de la voie des JNK *in vivo* en réponse à un mélange de bactérie à Gram négatif et à Gram positif *E. coli* et *M. luteus* (Boutros et al., 2002) ce qui n'est pas en accord avec l'approche de Northern blot que nous avons développée. Cette apparente contradiction pourrait être liée à des différences expérimentales (différences dans les temps choisis et dans la nature des pathogènes utilisés).

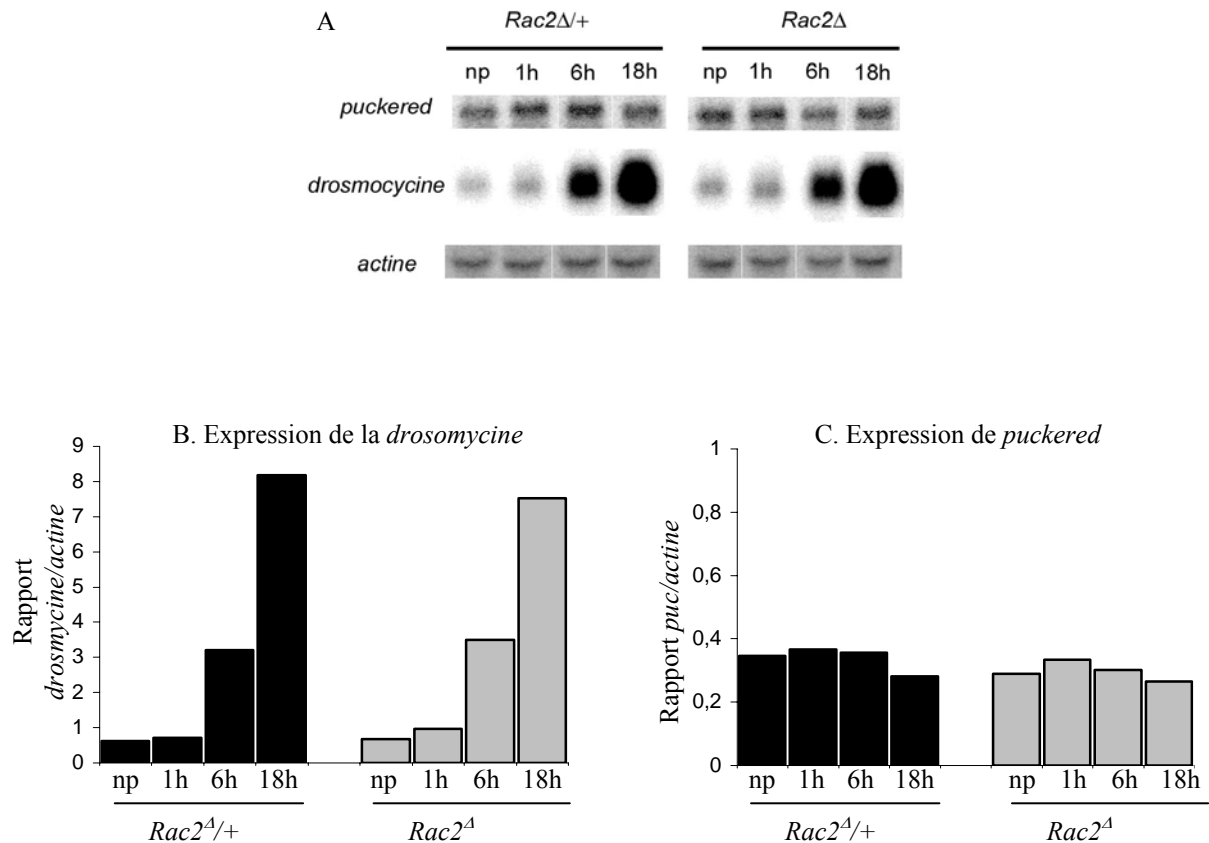


Figure III. 7 : Rac2 n'est pas nécessaire à l'activation de la transcription de la *drosmocycine* après infection par la bactérie à Gram positif *Enterococcus faecalis*.

A : résultat du Northern blot. Expression de *puc*, de la *diptéricine* et de la *drosmocycine* après infection par *Enterococcus faecalis* (culot bactérien). B-C Quantification de l'expression de la *drosmocycine* (B) et *puc* (C). L'actine sert de témoin interne.

np : mouches non piquées. 1h, 6h, 18h : temps en heures après infection.

B. L'expression de la *drosmocycine* est induite six heures après infection, elle continue à augmenter après 18 heures. La mutation *Rac2^Δ* n'a pas d'effet sur l'activation de la *drosmocycine*.

C. Après infection, l'expression de *puc* n'est pas induite.

Rac2 n'a donc pas d'effet sur les voies Toll et JNK en réponse aux infections par la bactérie à Gram positif *E. faecalis*.

3. Rac2 dans l'hématopoïèse

a. La mutation *Rac2^Δ* affecte la différenciation/multiplication des cellules à cristaux

Dans un premier temps nous avons testé si la mutation *Rac2^Δ* avait un effet sur l'hématopoïèse ou sur la morphologie des hémocytes.

Brièvement, les hémocytes de larves au stade L3 ont été récupérées en déchirant la cuticule au niveau dorsal puis déposés dans une boîte huit puits (Labtek, Chamber slides) en présence de PBS. Le noyau est marqué avec une solution de Hoechst (dilution au 1/1000^{ième}).

dans du PBS). Après perméabilisation des cellules au Triton X-100 0,1% ; l'actine est marquée en avec de la phalloïdine-FITC (5 µg/µl).

Aucune différence significative, aussi bien au niveau de la morphologie que du nombre des plasmatocytes entre les larves L3 mutantes *Rac2^Δ* et contrôles *Rac2^{Δ/+}* n'a été observée (Fig. III.8 C, D comparé A,B). Néanmoins, au cours d'autres tests, les cellules sont apparues moins nombreuses, plus petites et de forme moins régulière ; ces défauts pourraient être partiellement liés à un problème d'adhésion des cellules sur les lames. Rac2 pourrait donc avoir un rôle dans la morphologie des hémocytes. La mise en évidence de ce phénotype nécessite de définir des conditions expérimentales plus reproductibles.

Chez la larve, les cellules à cristaux sont visibles après avoir chauffé les larves au stade L3 pendant dix minutes à 70°C (Lanot et al., 2001; Zettervall et al., 2004). Dans ces conditions, les cellules à cristaux mélanisent et sont directement visibles à travers la cuticule. Nous avons regardé la présence des cellules à cristaux chez le mutant *Rac2*. Une première expérience a permis d'observer un nombre très réduit par rapport aux contrôles hétérozygotes (Fig. III.8 F par comparaison avec E). Ce résultat est en faveur d'un rôle de Rac2 dans la différenciation des cellules à cristaux.

D'après la littérature, Rac1 pourrait avoir un rôle dans la multiplication lamellocytaire (Zettervall et al., 2004), il serait donc possible que Rac2 agisse éventuellement en redondance avec Rac1, dans ce processus (non testé).

Une étude sur des cellules S2 traitées avec des dsRNA dirigés contre *puc*, a montré un défaut morphologique de ces cellules qui apparaissaient beaucoup plus rondes avec une désorganisation du réseau d'actine (Boutros et al., 2002), on pourrait supposer que les Rho GTPases ont un rôle dans la régulation de *puc* et pourraient aussi contrôler la morphologie cellulaire.

Puisque Rac2 semble être nécessaire à la différenciation des cellules à cristaux, la surexpression de Rac2 devrait aussi conduire à une surprolifération de ces cellules, ce que nous pourrions tester en utilisant l'inducteur IZ-Gal4 (Lebestky et al., 2000).

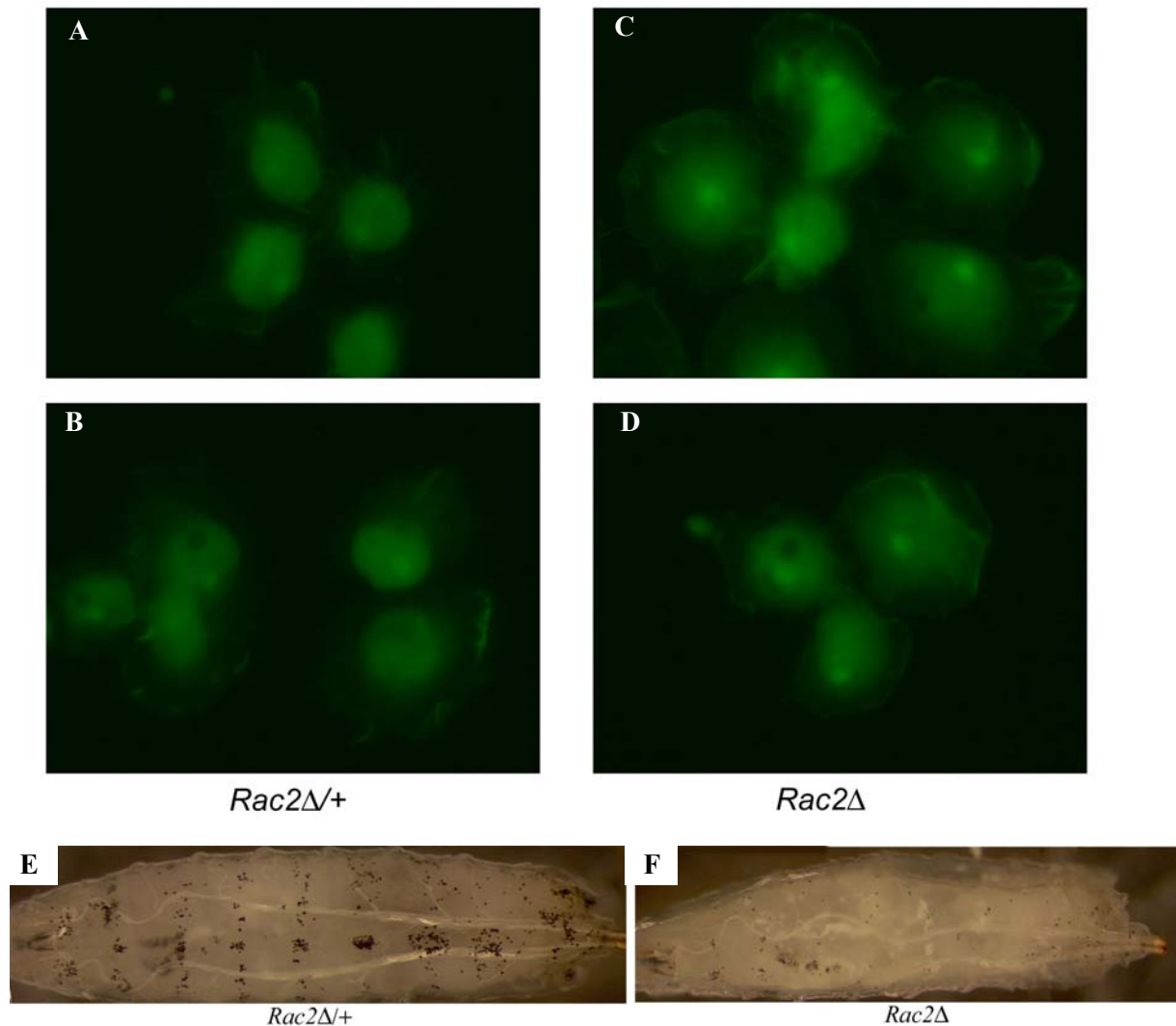


Figure III. 8 : Morphologie des hémocytes larvaires mutant *Rac2^Δ* et différenciation des cellules à cristaux

Marquage du cytosquelette d'actine à la phalloïdine-FITC, les hémocytes de huit larves sont récupérés dans des boîtes Labtek 8 puits (Chamber slides, Nunc) puis marqués. Les photographies sont prises au microscope inversé DMIRE2 (Leica) à l'aide d'une caméra numérique (LEICA, DC350F) et du logiciel Leica Qfluoro.

A-B : hémocytes des larves contrôles *Rac2^{Δ/+}*.

C-D : hémocytes des larves *Rac2^Δ*, aucune différence de morphologie significative n'est visible dans ces conditions expérimentales.

E-F : visualisation des cellules à cristaux après avoir chauffé 10 minutes à 70°C des larves au stade L3

E : larves contrôles *Rac2^{Δ/+}*. F : larves mutantes *Rac2^Δ*, les cellules à cristaux (cellules noires) sont nettement moins nombreuses. Photographies de vu à la loupe binoculaire Leica MZ FLIII, en utilisant une caméra numérique et le logiciel d'acquisition IM50.

b. Effet de la surexpression de Rac2 sur la morphologie des hémocytes larvaires

Les hémocytes des larves exprimant Rac2 sous le contrôle de crq-Gal4 ont été isolés et le cytosquelette d'actine marqué avec de la phalloïdine-FITC. La morphologie des cellules et leur nombre ne sont pas affectés par la surexpression de Rac2 (Fig. III.9 D-F comparé à A-C). Le niveau de surexpression n'est peut être pas suffisant pour induire un phénotype.

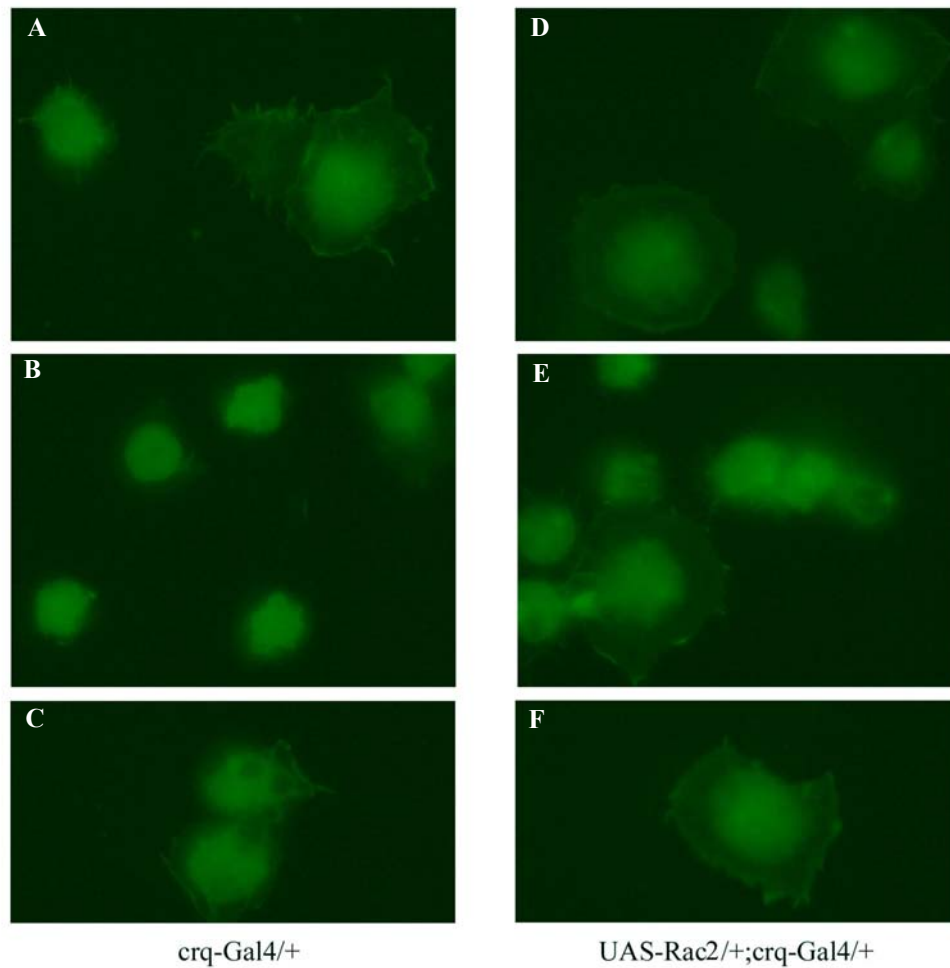


Figure III. 9 : Effet de la surexpression de *Rac2* sur la morphologie des hémocytes.

Morphologie des hémocytes larvaires mutant. Marquage du cytosquelette d'actine à la phalloïdine-FITC, les hémocytes de huit larves sont récupérés dans des boîtes Labtek 8 puits (Chamber slides, Nunc) puis marqués. Les photographies sont prises au microscope inversé DMIRE2 (LEICA) à l'aide d'une caméra numérique (LEICA, DC350F) et du logiciel Leica Qfluoro.

A-C : hémocytes contrôles crq-Gal4/+. D-F : hémocytes exprimant Rac2 (UAS-Rac2/+ ;crq-GAL4/+). Aucune différence de morphologie entre les hémocytes n'est visible.

4. Implication de Rac2 dans la réponse immunitaire cellulaire

Les Rho GTPases sont nécessaires au réarrangement du cytosquelette d'actine lors de la migration cellulaire et lors de la phagocytose. Chez les mammifères, Rac 1 et Rac2 permettent l'activation de la NADPH-oxydase qui produit des ions superoxydes participant à la destruction des pathogènes (Bokoch, 2005)

Chez la drosophile, l'implication des Rho GTPases dans la réponse immunitaire cellulaire a été peu étudiée.

a. Rac2 participe à la phagocytose des bactéries

Les Rho GTPases étant connues pour leur implication dans la phagocytose chez les mammifères, nous avons voulu savoir si la sensibilité du mutant *Rac2* aux infections était liée à un défaut de phagocytose. Les résultats obtenus avec ExoSGAP sont en faveur de cette hypothèse puisque la toxine affecte plus particulièrement la phagocytose.

Nous avons préféré l'approche *ex vivo* à l'approche *in vivo* étant donné que le nombre et la taille des cellules sont parfois affectés chez le mutant, ce qui n'est pas visible *in vivo*, chez l'adulte.

Comme précédemment (Résultats chapitre I), nous avons utilisé l'approche *ex vivo* à partir d'hémocytes isolées de larves au stade L3 en présence de bio-particules fluorescentes (Pearson et al., 2003).

Avec Jackie Perrin, nous avons montré que les cellules déficientes pour Rac2 ont une capacité phagocytaire diminuée de 47 % +/- 8 comparées aux cellules issues d'individus hétérozygotes *Rac2^{A/+}*, pour des particules fluorescentes issues de bactéries à Gram négatif (*E. coli K12 fluorescein conjugated*, molecular probes) (Tab. III.2), cette diminution est de 39 % +/- 11 pour des bactéries à Gram positif (*S. aureus fluorescein conjugated*, molecular probes) (Tab. III.3). Rac2 participe donc à la phagocytose des pathogènes, son rôle est probablement de contrôler le cytosquelette d'actine au cours de ce processus. Il est peu probable que l'implication de Rac2 dans la phagocytose soit liée à un effet des JNK qui peuvent réguler des protéines du cytosquelette (Boutros et al., 2002), puisque des dsRNA dirigés contre des éléments de la voie des JNK n'ont pas d'effet sur la capacité des cellules S2 à phagocyter (Kallio et al., 2005).

La diminution de la capacité à phagocyter des mutants *Rac2* est proche de l'inhibition obtenue avec l'expression d'ExoSGAP dans les hémocytes, suggérant que Rac2 est une protéine cible majeure d'ExoSGAP dans les hémocytes. Cette diminution est aussi proche de la valeur obtenue chez un mutant *dSCAR* (Pearson et al., 2003), un régulateur du cytosquelette d'actine pouvant être partiellement contrôlé par les Rho GTPases (Rogers et al., 2003). Ceci est en accord avec un rôle commun de ces deux protéines dans le contrôle du cytosquelette d'actine au cours de la phagocytose. On peut supposer que Rac2 est un activateur de dSCAR.

L'implication des autres Rho GTPases dans la phagocytose est probable, la phagocytose étant encore possible bien que réduite chez le mutant *Rac2*.

Tableau III. 2 : Les hémocytes larvaires *Rac2^Δ* présentent une déficience de phagocytose des particules issues de bactéries à Gram négatif (*E. coli*) marquées à la fluorescéine par rapport aux hétérozygotes *Rac2^{Δ/+}*

Génotype	Nombres de plasmatoctes	Particules phagocytées de <i>E. coli</i>	Index phagocytyque
<i>Rac2^{Δ/+}</i>	98	158	1,612
	107	206	1,925
	92	200	2,174
	120	171	1,425
	153	315	2,059
	71	113	1,592
	Total = 641	Total = 1163	Moyenne = 1,800 +/- 0,300
<i>Rac2^Δ</i>	225	209	0,93
	154	120	0,779
	178	151	0,848
	116	75	0,647
	358	277	0,774
	Total = 1031	Total = 832	Moyenne = 0,795 +/- 0,104

Le tableau III.3 est le résultat d'un comptage d'une des trois expériences. Taux d'inhibition (%) = 55,76% calculé avec la formule suivante : $100 - (\text{index moyen de } Rac2^{\Delta} \times 100 / \text{index moyen de } Rac2^{\Delta/+})$ ($P < 0,01$).

Tableau III. 3 : La mutation *Rac2^Δ* diminue la phagocytose des particules mortes de *S. aureus* couplées à la fluorescéine

Génotype	Nombres de plasmatoctes	Particules phagocytées de <i>S. aureus</i>	Index phagocytyque
<i>Rac2^{Δ/+}</i>	100	113	1,130
	102	107	1,049
	117	139	1,188
	106	116	1,094
	125	138	1,104
	Total = 550	Total = 613	Moyenne = 1,113 +/- 0,05
<i>Rac2^Δ</i>	101	55	0,545
	96	70	0,729
	107	88	0,822
	118	93	0,788
	116	89	0,767
	Total = 538	Total = 395	Moyenne = 0,730 +/- 0,109

Le tableau III.3 est le résultat d'un comptage d'une des quatre expériences. Taux d'inhibition (%) = 34,4 % calculé comme dans le Tableau III.2 ($P < 0,01$).

b. Implication de Rac2 dans l'activation de la production d'ions superoxydes

Au cours d'une infection, les espèces réactives de l'oxygène jouent un rôle important dans la destruction des pathogènes. Chez les mammifères, l'ion superoxyde est produit par la NADPH-oxydase par certains leucocytes au niveau membranaire et dans la vacuoles de phagocytose (macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques...). La NADPH-oxydase

(NOX2) est régulée par les Rho GTPases et plus particulièrement par Rac2 dans les cellules sanguines.

Chez la drosophile, l'activité de la NADPH oxydase n'a jamais été montrée directement, bien que des ions superoxydes soient produits. Deux gènes codent pour des protéines pouvant avoir une activité NADPH-oxydase : CG3131 correspond à une DUOX (DUAL-Oxydase) et aurait une double activité NADPH-oxydase et peroxydase. La deuxième protéine est codée par CG3896 et présente des homologies avec NOX5 des mammifères.

Le fait que seuls ces deux gènes codent pour des NADPH-oxydases et que des ions superoxydes soient produits après infection (Nappi et al., 1995; Nappi et Vass, 1998), font de CG3131 et CG3896 de bons candidats pour la production d'ions superoxydes au cours de l'infection.

➤ Test de l'activité NADPH-oxydase en cellules S2

J'ai testé si les cellules S2 ou les hémocytes produisent des ions superoxydes pour essayer de mettre en évidence une activité NADPH-oxydase.

J'ai utilisé les cellules de la lignée S2 pour tester deux approches classiquement utilisées au laboratoire sur les cellules HL60 (lignée cellulaire myéloïde humaine). Les cellules S2 sont des dérivés de cellules d'origine embryonnaire de type macrophage (Schneider, 1972). Ces cellules sont capables de synthétiser après stimulation des peptides antimicrobiens et elles sont capables de phagocytose. On suppose qu'elles possèdent une NADPH-oxydase comme les cellules phagocytaires des mammifères. J'espère pouvoir évaluer par une approche d'ARN interférence (RNAi) l'implication de Rac2 dans l'activation de la NADPH-oxydase.

• Test de la réduction du cytochrome c

Avec le Dr Marie-Josèphe Rabiet, nous avons évalué la production d'ions superoxydes par les cellules S2 par le test de réduction du cytochrome c. Dans cette technique, la production d'ions superoxydes est mesurée de manière indirecte par mesure de la réduction du cytochrome C par les ions superoxydes après stimulation. Ce test permet de mesurer l'activité de la NADPH-oxydase membranaire notamment chez les cellules de type neutrophile après stimulation par le PMA (Phorbol Myristate Acétate).

Dans ces expériences, les cellules sont stimulées par ajout de PMA (1 à 5 µg/ml final), ou avec 20-40 µg particules *E. coli* 12 (*E. coli* K12 fluorescein conjugated, 20mg/ml, molecular probes). La réduction du cytochrome c est ensuite évaluée à 25°C sur quelques minutes.

En l'absence de tout activateur, le cytochrome c est légèrement réduit (0,35 nmole/10⁶ cellules/minute) alors qu'aucune réduction n'est observée avec les cellules de type neutrophile HL60 dans ces conditions (Marie-Joseph Rabiet, communication personnelle). Ainsi, le niveau de base de production des ions superoxydes semble relativement important. L'ajout de 1 µg/ml de PMA, ce qui correspond à la concentration classique utilisée dans ce type test, n'induit pas la production d'O₂^{•-}. Une augmentation de la quantité de PMA utilisée ne permet pas d'observer un effet inducteur. Le PMA ne permet apparemment pas d'observer une activité de la NADPH-oxydase chez la drosophile. Nous avons donc changé d'activateur en ajoutant 20-40 µg particules *E. coli* 12 (*E. coli* K12 fluorescein conjugated, 20mg/ml, molecular probe). La réduction du cytochrome c est parfois légèrement augmentée mais de manière peu significative. Afin d'optimiser la réponse, nous avons stimulé les cellules de manière séquentielle par ajout de PMA puis au bout de deux à trois minutes par ajout des bio-particules. Là encore, nous n'avons observé aucun effet activateur net.

La production basale d'ions superoxydes par les cellules S2 pourrait être due à la présence de débris cellulaires dont des débris mitochondriaux contenant la cytochrome oxydase du complexe IV de la chaîne respiratoire pouvant produire des ions superoxydes. Nous avons donc ajouté de l'azide de Sodium (NaN₃) à une concentration de 0,2 mM à 1 mM, afin de bloquer la cytochrome oxydase du complexe IV. En présence d'Azide de Sodium à forte concentration (1mM), la production constitutive d'ions superoxydes n'est pas affectée dans les cellules S2 non stimulées.

Dans ces conditions, les cellules S2 semblent générer des ions superoxydes en absence de tout activateur. La stimulation ne permet pas d'observer une activation spécifique et significative d'une éventuelle NADPH-oxydase, il pourrait y avoir une production des ions superoxydes dans les vacuoles de la cellule ce qui ne peut pas être mis en évidence par cette technique.

Afin de confirmer que la réduction du cytochrome c observée est bien due à la production d'anions superoxydes, les expériences seront refaites en présence de la superoxyde dismutase (SOD) qui devrait inhiber la réduction du cytochrome c associée à la production d'O₂^{•-} ou en présence de DPI (**D**iphenylene **I**odonium) un inhibiteur de la NADPH-oxydase.

- **Test de la réduction du NBT (nitrobleu de tétrazolium)**

La production d'ions superoxyde peut aussi être visualisée directement avec le test du NBT. Les ions superoxydes produits par la cellule permettent la réduction du NBT qui précipite sous forme de formazan, les cellules vont progressivement être « auréolées » de bleu.

Les cellules S2 se colorent progressivement en bleu, la coloration maximale est obtenue 2 heures après le début de l'expérience (résultat non montré). Là encore, on observe une production lente et spontanée d'ions superoxydes par les cellules S2 (Fig. III.10). La stimulation par des doses variables de bio-particules ou en présence de PMA, ne permet pas de mettre en évidence une induction significative de la production d'espèces réactives de l'oxygène bien que les cellules stimulées par les bio-particules soient légèrement plus colorées (Fig. III.10). Des conditions optimales seront recherchées pour mettre en évidence cette activation.

Nous avons effectué la même expérience sur des hémocytes isolés à partir de larves L3. L'expérience n'a pas été menée au-delà de une heure trente par crainte d'une baisse de viabilité des cellules dans ces conditions de culture (milieu DMS sans sérum avec 40 mM de glucose). Apparemment, les plasmotocytes ne produisent pas dans ces conditions des ions superoxydes ou alors en trop faible quantité pour être détectable à l'œil et cela aussi bien dans les puits témoins que dans les puits contenant des cellules mutantes *Rac2^Δ*. Il est nécessaire de faire ce test à nouveau mais en présence de particules bactériennes pour voir si dans ces conditions la production d'ions superoxydes est induite.

Ces résultats préliminaires montrent que les cellules S2 produisent apparemment des ions superoxydes en absence de toute stimulation. Les conditions optimales de ce type de tests restent donc à définir sur ce type de cellule. Il est aussi nécessaire de vérifier que la réduction du NBT et du cytochrome C est bien liée à l'activité de la NADPH-oxydase et non à la présence d'autres agents réducteurs. D'autres tests seront développés par exemple la réduction du NBT peut être évaluée par mesure de l'absorbance à 550 nm (Elsen et al., 2004).

Les cellules S2 paraissent produire de manière constitutive des ions superoxydes qui sont toxiques pour la cellule. Il pourrait exister en parallèle un mécanisme de détoxification qui permettrait d'éliminer progressivement les espèces réactives produites et qui devrait reposer sur l'expression elle aussi constitutive de la catalase et de la superoxyde dismutase.

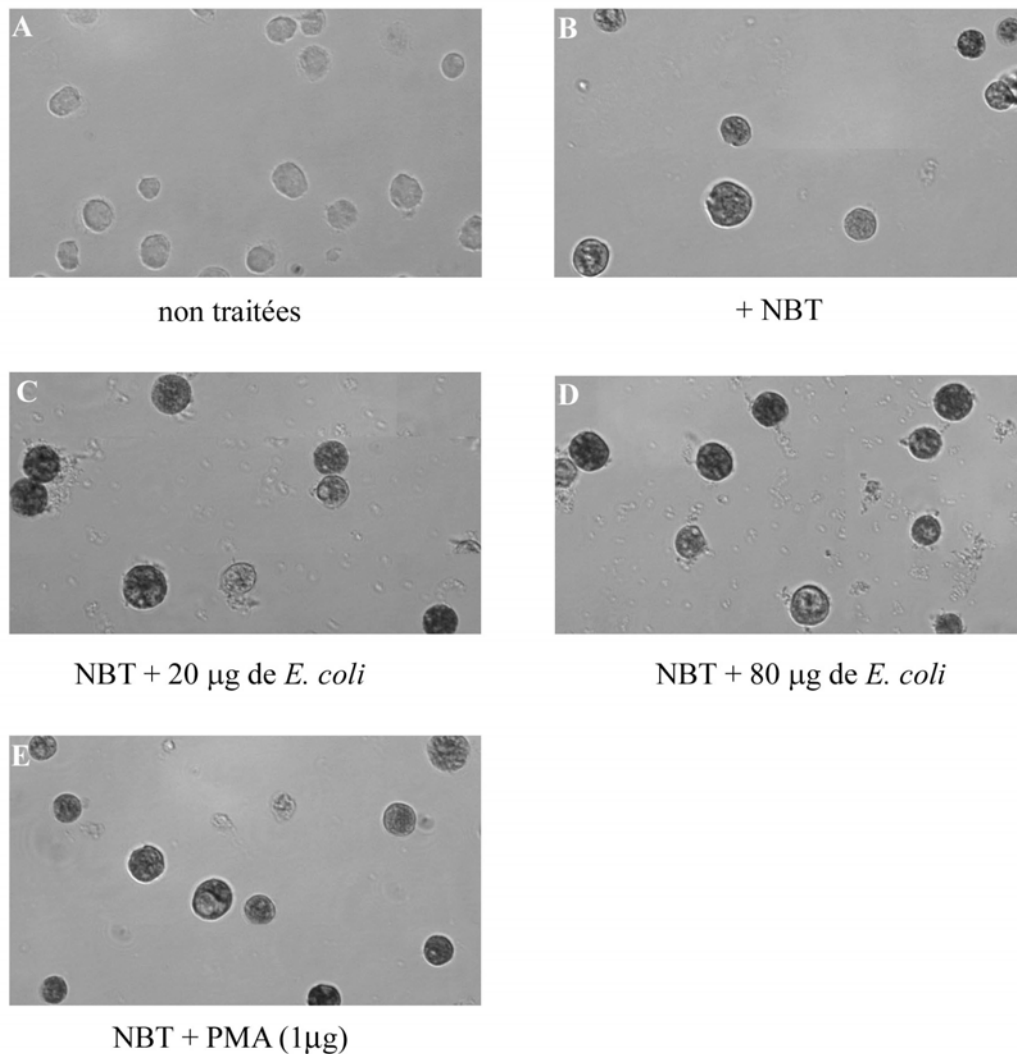


Figure III. 10 : Test de la réduction du NBT, mise en évidence de l'activité NADPH-oxydase des cellules S2.

Les cellules S2 que ce soit en absence de stimulation ou de doses variables de particules issues de *E. coli* (*E. coli* K12 fluorescein conjugated, Molecular Probes) 20 (C) ou 80 µg (D) ou de 1 µg de PMA (E) à 25°C. A : cellules non traitées, B : cellules non stimulées avec NBT 100 µM.

L'apparition de la coloration bleue est suivie au cours du temps, ici après 4 heures de stimulation.

En absence d'activateur, le NBT est réduit donc des ions superoxydes sont produits (B). La stimulation par des bactéries semblent induire une production plus importante d'ions superoxydes (C-D) et les cellules apparaissent beaucoup plus colorées comparé à l'effet induit par le PMA (E).

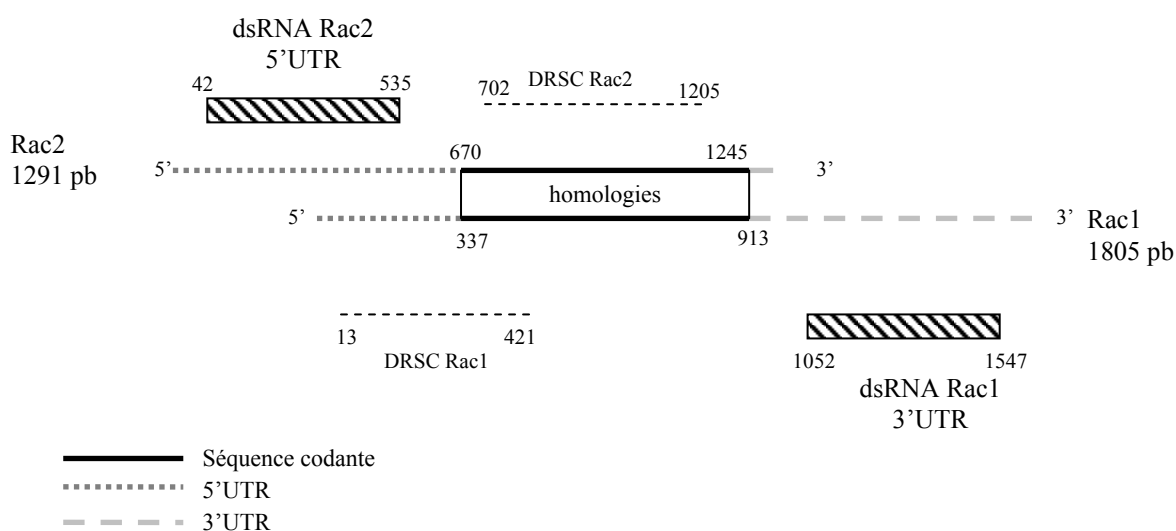
➤ Mise au point des expériences d'ARN interférence pour les tests d'activité de la NADPH-oxydase en cellules S2

Dans la perspective de mettre en évidence une activité NADPH-oxydase, nous voulons tester le rôle possible de Rac2 dans son activation.

Deux types d'approche par ARN interférence (RNAi) sont envisagés pour répondre à cette question. Des expériences de RNAi contre la NADPH-oxydase devraient permettre de

prouver son implication dans la production par d'anions superoxydes. L'inactivation de Rac2 par une même approche pourrait permettre de tester son rôle dans l'activation de la NADPH-oxydase.

Nous avons sélectionné des amorces qui vont permettre de générer des doubles brins d'ARN (dsRNA) nécessaires pour effectuer des expériences de RNAi. Pour vérifier que la production d'ions superoxydes dépend bien de la protéine codée par CG3131 et éventuellement de CG3896, nous allons essayer d'inhiber cette activation constitutive par RNAi. Nous avons choisi d'utiliser les amorces suggérées pour produire le dsRNA par le **Drosophila RNAi Screening Center (DRSC)** (<http://flyrnai.org>) (Fig. III.11).



Amorces	Sens	Taille	Séquences des amorces pour synthèse des dsRNA (5'-3') avec séquence promoteur T7 (minuscules) pour la transcription <i>in vitro</i>
Rac2 5'UTR	sens	496 pb	taatacgactcactatagg GCCACAGAAAATCAGCAAATCC
	anti-sens		taatacgactcactatagg TGGTTTTCTTTGTGGCAGCTT
Rac1 3'UTR	sens	496 pb	taatacgactcactatagg TGCCACTAATTTCCGCTGCT
	anti-sens		aatacgactcactatagg TCGCTTCGATATCCAACAACA
CG3131 NADPH-oxydase (DUOX) (DRSC)	sens	491 pb	aatacgactcactatagg AAAAGAACTACGGTCTCCAG
	anti-sens		aatacgactcactatagg GTGGTCAGTGTGGAGGAGT
CG3896 NOX (DRSC)	sens	484 pb	aatacgactcactatagg ACAGCCTGCACTCCCAAA
	anti-sens		aatacgactcactatagg TGCTCCCAGGACTCGTTT

Figure III. 11 : Localisation des séquences de Rac1 et Rac2 ciblées par les dsRNA suggérées par le DRSC ou sélectionnées au laboratoire et tableau des séquences des amorces pour la synthèse des doubles brins.

Pour Rac2, je n'ai pas choisi les amorces suggérées par le DRSC car la séquence cible du dsRNA dirigé contre *Rac2* peut aussi interférer avec l'expression de *Rac1* et *cdc42*. J'ai donc choisi des amorces dans la région 5' non transcrite (5'UTR) qui est spécifique de *Rac2* (Fig. III.11 A, B).

Une expérience par Northern blot a montré que les doubles brins générés par transcription *in vitro*, diminue bien l'expression de *Rac2* dans les cellules S2 après quatre jours d'incubation avec les dsRNA. Nous allons donc pouvoir tester l'effet de Rac2 sur la production d'ions superoxydes.

Afin d'évaluer la spécificité de Rac2 dans l'activation de la NADPH-oxydase, nous allons tester de la même manière l'effet de la perte d'expression de *Rac1*. Nous avons choisi des amorces dans la région 3' non transcrite (3'UTR) spécifique de *Rac1* afin d'éviter des interférences avec le gène *Rac2* (Fig. III.11).

Les expériences de RNAi devraient permettre de répondre aux questions sur l'activité de la NADPH-oxydase et l'implication de Rac2 dans son activation. Les expériences *ex vivo* à partir d'hémocytes isolés de larve L3, pour la mesure de la production d'ions superoxydes et les conditions des tests en RNAi sont à améliorer.

III. Conclusion

Le mutant *Rac2^Δ* est le seul mutant de Rho GTPases parfaitement viable ce qui est en accord avec un rôle de Rac2 chez l'adulte. Peu d'études avaient permis de mettre en évidence un rôle spécifique de Rac2 chez la drosophile en raison d'une redondance fonctionnelle avec Rac1 et Mtl au cours du développement. Nous avons montré une fonction spécifique de Rac2 dans la réponse immunitaire. Rac2 est nécessaire à la résistance aux infections bactériennes aussi bien à Gram positif que négatif. Son implication dans la réponse aux infections fongiques et par des levures reste à déterminer.

La fonction de Rac2 dans la réponse immunitaire dépend de son rôle dans la phagocytose et des voies de signalisation de la réponse immunitaire probablement contrôlée par cette GTPase (Fig. III.12).

- Rac2 pourrait intervenir dans l'activation de la voie des JNK. La surexpression de Rac2 chez l'adulte active la transcription de *puc* et n'agit pas sur l'activation NF-κB dépendante de la diptéricine. L'absence d'activation tardive de *puc* chez le mutant *Rac2^Δ* après infection par

des bactéries à Gram négatif est en faveur d'un rôle de Rac2 dans la régulation de cette voie, mais cet effet reste à confirmer.

Aucun effet de l'expression de la toxine ExoSGAP sur l'induction de la voie des JNK avait été observée après infection (voir Résultats chapitre I). ExoSGAP n'inhibe probablement pas à 100 % les Rho GTPases et une activité même faible de Rac2 pourrait être suffisante pour maintenir l'activation de la voie des JNK. Les résultats génétiques suggèrent également une interaction entre ExoSGAP et la voie des JNK qui pourrait dépendre de l'effet de la toxine sur Rac2. Il est peu probable que Rac2 soit un intermédiaire entre TAK1 qui peut activer directement la voie JNK, au cours de l'infection (Silverman et al., 2003). Rac2 serait plus probablement un activateur d'une autre JNKK après infection. L'interaction exacte entre la voie des JNK et Rac2 au cours de la réponse immunitaire reste à définir.

- Nous avons observé qu'une infection par PAO1 active la voie Toll et la synthèse de la drosomycine, cette induction est un peu plus forte chez le mutant *Rac2^Δ*. Rac2 pourrait donc agir dans un processus de rétrocontrôle négatif de la voie Toll lors d'une infection par une bactérie à Gram négatif.

L'implication des autres Rho GTPases dans la résistance aux infections et / ou dans la phagocytose n'est pas exclue puisque des mutants présentant une perte totale de fonction n'ont pas pu être testés. Cette implication est même probable puisque chez le mutant *Rac2^Δ* le niveau de phagocytose n'est diminué qu'à une hauteur d'environ 45 %, ce qui suggère une redondance partielle des Rho GTPases entre elles. On peut aussi supposer que les Rho GTPases vont intervenir dans l'adhérence et la migration des hémocytes au cours de la réponse immunitaire par analogie avec les mammifères.

D'après les résultats obtenus au cours de cette étude Rac2 a mis en évidence son rôle important dans la réponse immunitaire. Comme chez les mammifères, il semble y avoir une spécificité des Rac dans certains processus de la réponse immunitaire. Chez les mammifères, Rac1 est exprimée dans tous les tissus, alors que Rac2 est exprimée majoritairement dans les cellules hématopoïétiques. Chez la souris, Rac1 et Rac2 ont des rôles différents dans les leucocytes comme par exemple les neutrophiles (Yamauchi et al., 2004; Yamauchi et al., 2005). On peut donc supposer que de la même manière que les GTPases Rac1 et Rac2 de la drosophile ont chacune des rôles spécifiques au sein de la cellule, Rac2 pourrait avoir une fonction prépondérante dans l'immunité chez la drosophile. Néanmoins, le rôle de Rac1 dans la réponse immunitaire de la drosophile n'a pas pu être étudié.

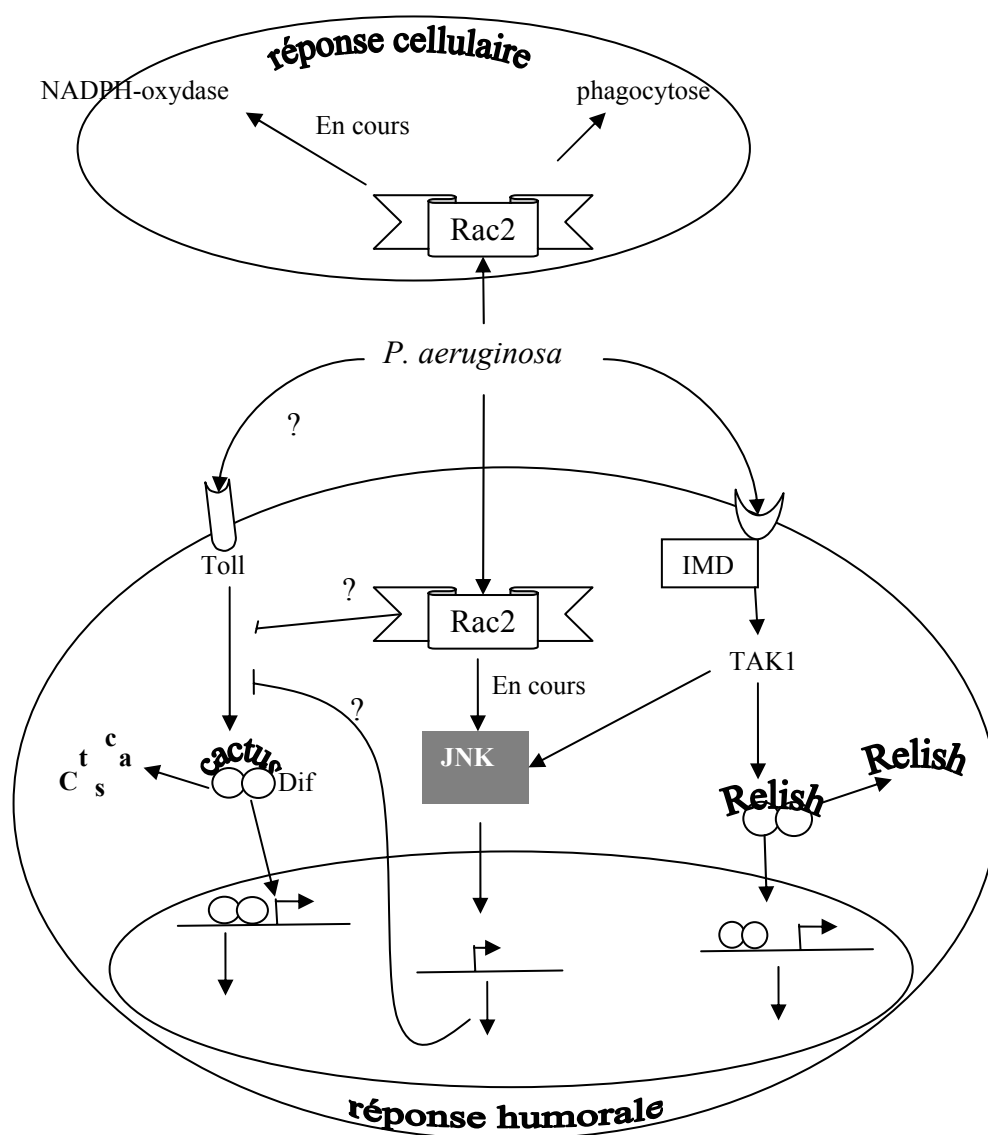


Figure III. 12 : Modèle de l'implication de Rac2 dans la réponse immunitaire chez la drosophile

RESULTATS

CHAPITRE 4

RECHERCHE DE GENES IMPLIQUES

DANS LA REPONSE AUX STRESS

INFECTIEUX ET OXYDANT

I. Introduction

Au cours d'une infection, des espèces réactives de l'oxygène (ROS : **R**eadive **O**xygen **S**pecies) ou de l'oxyde nitrique sont produits. Ces molécules vont avoir un rôle double en activant certaines voies de signalisation de la réponse immunitaire et de la réponse au stress et elles vont aussi participer à la destruction des pathogènes (Nappi et al., 1995; Nappi et Vass, 1998; Nappi et al., 2000; Foley et O'Farrell, 2003). Ces ROS ont aussi des effets délétères sur l'organisme. Par exemple, des cellules endothéliales de mammifères en culture infectées par *Pseudomonas aeruginosa* produisent des ions superoxydes visant à détruire les bactéries intracellulaires. Le pourcentage de mort cellulaire dans la culture infectée est diminué de façon significative par l'expression d'un anti-oxydant prouvant le caractère nocif des espèces oxydantes produites au cours de l'infection bactérienne (Valente et al., 2000). Les espèces réactives de l'oxygène sont aussi produites lors du métabolisme normal, où elles peuvent entraîner des dommages cellulaires. Il existe donc des mécanismes de détoxification qui vont permettre de les éviter et de conserver un équilibre redox optimal.

Les espèces réactives de l'oxygène et les pathogènes sont capables d'induire plus ou moins directement des voies de signalisation communes et l'expression de mêmes gènes cibles (De Gregorio et al., 2001; Irving et al., 2001; Boutros et al., 2002; De Gregorio et al., 2002b; Girardot et al., 2004). En particulier, les voies impliquant les JNK et les facteurs de transcription NF- κ B répondent aux deux stress.

L'équipe du Dr H. Tricoire (Institut Jacques Monod, Paris) cherche à identifier les nouveaux gènes modulant la résistance au stress oxydant de *D. melanogaster* et à comprendre leur implication dans la longévité. Ils ont testé une collection de 2 200 lignées mutantes P[UY] pour leur résistance à deux types de stress oxydant (H_2O_2 et paraquat, un générateur d' $O_2^{\bullet-}$). 180 lignées P[UY] ont été sélectionnées comme ayant un phénotype de sensibilité ou de résistance face à un stress oxydant (Monnier et al., 2002a; Monnier et al., 2002b).

J'ai testé environ 105 des lignées candidates identifiées par le Dr Hervé Tricoire pour leur résistance ou sensibilité aux infections par *P. aeruginosa*. En partant de l'hypothèse que les mécanismes de résistance aux stress oxydants ou infectieux possèdent des dénominateurs communs, nous espérons identifier de nouveaux gènes impliqués dans l'immunité et étudier les corrélations entre les réponses aux stress oxydant et infectieux chez la drosophile.

II. Résultats

Les 105 lignées UY (P[y⁺,UAS] ou P[Mae-UAS.6.11]) ont été croisées avec la lignée inductrice da-Gal4 afin de déréguler de façon ubiquitaire dans la descendance le gène cible. Les croisements sont effectués à 25°C. Au minimum 30 individus de la descendance F1 ont été testés en infection par piqûre septique par la bactérie pathogène *Pseudomonas aeruginosa* (souche de référence PAO1) (Fig. IV.1).

On suppose que la surexpression de gènes peut permettre une meilleure résistance des mouches aux infections, s'il s'agit par exemple de gènes codant des protéines impliquées dans l'activation de la réponse immunitaire ce qui permettrait une réaction plus rapide de l'organisme. Au contraire, des éléments qui réguleraient négativement les voies de signalisation de la réponse immunitaire lorsqu'ils sont surexprimés, devraient diminuer la résistance aux infections.

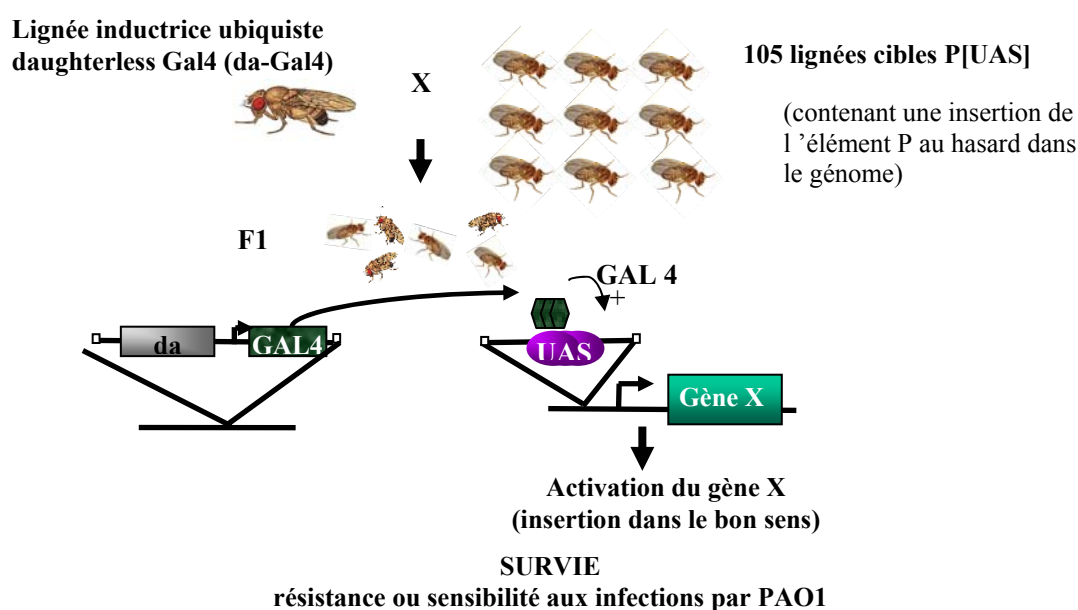


Figure IV. 1 : Principe de la dérégulation de l'expression de gènes pour la recherche de gènes impliqués dans la réponse au stress infectieux

1. Résultats généraux

a. Première série de test de résistance

Une bonne partie des lignées testées n'a pas présenté de phénotype particulier par rapport aux infections par PAO1. Les lignées qui apparaissent sensibles ou résistantes aux infections présentent la plupart du temps un écart faible par rapport au témoin. Nous avons

conservé la majorité des lignées présentant des écarts faibles par rapport au contrôle, pour les tester une deuxième fois en surexpression ou dans certains cas en perte partielle de fonction (absence du facteur Gal4) (en cours). Nous avons sélectionné les gènes candidats présentant soit une résistance, soit une sensibilité à l'infection.

Cette deuxième série de tests des lignées candidates est en cours d'analyse et permettra d'éliminer une bonne partie des faux positifs. Nous avons aussi choisi dans les lignées UY, certains gènes qui bien que ne présentant pas de phénotype particulier, pourraient avoir un rôle dans la réponse immunitaire d'après les données moléculaires des gènes ciblés par les éléments P[UY].

Dans un certain nombre de cas l'insertion de l'élément P est en inverse du gène situé à proximité (UY1358, UY1726...), il est difficile de savoir si les effets observés sont dus à une perte partielle de fonction ou non du gène à proximité duquel l'élément P est inséré ou à la dérégulation de gènes situés bien plus loin en aval. Il serait nécessaire de tester l'effet de l'insertion seule sur la résistance aux infections et de vérifier, par Northern blot, s'il y a bien une perte de fonction de ces gènes, la plupart de ces lignées n'ont pas été retenues. Dans cette partie, je ne présenterai, sauf indication, que des gènes où l'élément P est inséré dans le bon sens par rapport au gène cible. Les résultats sont préliminaires et sont à confirmer et à approfondir.

b. Détermination du site d'insertion par PCR-inverse

Les éléments UY sont insérés au hasard dans le génome, il est donc nécessaire de déterminer leur site d'insertion dans le génome par PCR-inverse. La majorité des sites d'insertion des éléments P a été cartographiée par l'équipe du Dr H. Tricoire. Après la première série d'infections, nous avons identifié par PCR inverse, le site d'insertion de quelques unes des lignées UY candidates. Le séquençage des bords flanquants de l'élément P permet d'identifier les gènes correspondants par BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) par rapport au génome de *Drosophila melanogaster* (<http://flybase.bio.indiana.edu/>).

Nous avons déterminé le site d'insertion de cinq lignées candidates qui ont présenté en dans un premier temps une sensibilité ou une résistance aux infections (Tab. IV.1).

Tableau IV. 1 : Détermination du site d'insertion de l'élément UY dans le génome pour cinq lignées candidates

Lignées	Sites d'insertion
UY2289	-inséré dans un intron du gène CG15186, UAS sens inverse, fonction inconnue.
UY1597 (confirmation de l'insertion)	-inséré 38pb après le début de transcription du gène CG7841 (FBgn0036502), UAS sens inverse, -inséré à 874 pb du gène Z600, UAS bon sens, - inséré à 1195 pb du gène CG33088 (FBgn0053088), UAS bon sens, -inséré à 2803 pb du gène Eip71CD, UAS bon sens
UY1112	-inséré 493 pb en amont du début de transcription de l'adénylate kinase 1 (CG17146), UAS sens inverse
UY511	-inséré dans le gène CG6424 (FBgn0028494), perte de fonction putative pour le transcrit RA. Homologue de la protéine humaine ' protéine KIAA0914 '
UY1507	- inséré 162 pb après le début du transcrit du gène CG5505, codant pour une protéine UBP (Ubiquitin-specific Processing protease) possédant des orthologues chez les mammifères

La présence d'un élément P peut modifier l'expression d'un gène à plus de 10kb du site d'insertion (Nicolai et al., 2003)

c. Analyse des résultats

Les résultats obtenus au cours de ces tests sont difficilement reproductibles et nous en concluons que cette stratégie n'est pas applicable pour un crible à grande échelle et elle va être abandonnée. Actuellement, 35 % des lignées ont présenté un phénotype de résistance (Tab. IV.2) ou sensibilité au stress infectieux (Tab. IV.3) et font l'objet de tests plus approfondis.

Parmi les lignées qui possèdent une insertion de l'élément P dans le bon sens et qui sont résistantes aux infections en contexte da-Gal4 : on retrouve des gènes du métabolisme (UY109, UY1083), un gène codant une protéine de régulation de l'expression de l'ADN (UY2006), un gène codant un composant de la matrice extracellulaire ten-m (UY1780) ainsi qu'un certain nombre de protéines de fonction encore inconnue. Ces effets demandent cependant une confirmation en testant l'effet de la surexpression sur la réponse aux stress infectieux sur un plus grand nombre d'individus et en regardant l'effet de l'insertion de l'élément UY potentiellement mutante sur la survie des mouches aux infections. L'effet sur la résistance suggère un rôle de ces gènes dans la potentialisation de la réponse immunitaire ce qui pourrait être testé en évaluant l'activation des peptides antimicrobiens, ou des gènes cibles de la voie des JNK ou de la voie des JAK/STAT...

➤ **Implication de *enabled* : un gène impliqué dans le cytosquelette d'actine**

L'insertion de l'élément P à proximité du gène *enabled* (*ena*) en absence d'inducteur rend les mouches plus sensibles aux infections par ingestion de PAO1 (Tab. IV.4). L'élément P pourrait induire une perte partielle de fonction de *enabled*, ce qui reste à confirmer. *enabled* code une protéine du cytosquelette pouvant fixer l'actine et participant à la dynamique du cytosquelette (Krause et al., 2003). Il s'agit d'un gène induit par le stress oxydant (Girardot et al., 2004), des expériences de RNAi en cellules S2 ont montré que la diminution de son expression conduit à une plus forte induction de la diptéricine après stimulation par le LPS (Foley et O'Farrell, 2004). Ceci suggère que *enabled* jouerait un rôle dans le rétrocontrôle de la synthèse des peptides antimicrobiens, peut-être pour éviter une activation anarchique des gènes cibles de Relish en l'absence d'infection. Chez les mammifères, les protéines de la famille Ena/VASP participent à la phagocytose dépendante du récepteur Fc en régulant le cytosquelette d'actine (Coppolino et al., 2001). La sensibilité que nous avons observée, pourrait être liée à un défaut dans la régulation de la synthèse des peptides antimicrobiens ou à un problème de phagocytose.

➤ **Implication de la ferritine**

L'insertion UY1102 dans le premier intron du gène *fer1HCH* (chaîne lourde de la ferritine) peut induire une perte partielle de la fonction du gène. Le test de l'insertion seule a montré un phénotype de sensibilité aux infections naturelles (Tab. IV.4). Des expériences ont montré que la protéine est présente dans l'hémolymph, sa concentration augmente rapidement après infection des larves (Vierstraete et al., 2003; Vierstraete et al., 2004). Au contraire, chez l'adulte, des approches protéomiques de la réponse immunitaire ont montré une diminution de sa concentration 6 heures après infection par des champignons (Levy et al., 2004). La ferritine est une macromolécule qui pourrait participer à la réponse immunitaire.

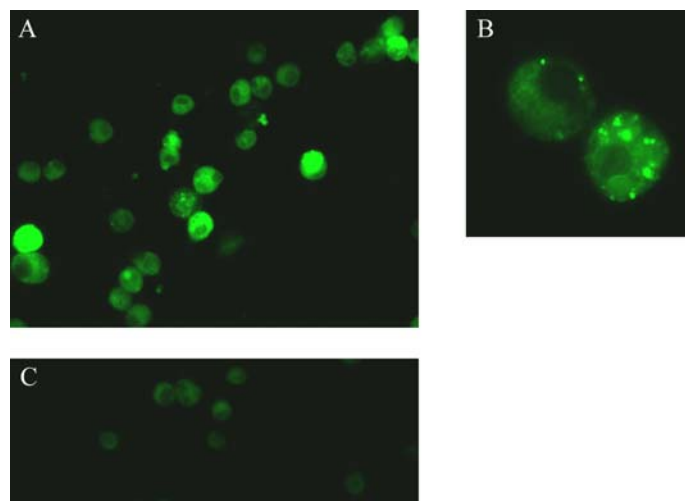


Figure IV. 2 : Expression de la protéine fusion FER1HCH-GFP (lignée G00237) dans les hémocytes larvaires.

La totalité des hémocytes présente une fluorescence associée à l'expression de la GFP (A, B) par rapport aux hémocytes w^{1118} (C). L'intensité de fluorescence est variable entre les cellules, le marquage est souvent ponctué suggérant la présence de la ferritine dans des vésicules. A, C grossissement x40, B grossissement x100.

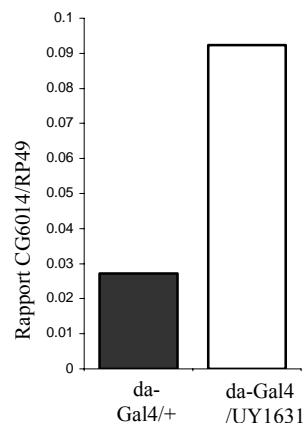
Nous avons analysé l'expression de la chaîne lourde de la ferritine à partir des lignées transgéniques « fly trap », où le gène de la GFP (Green Fluorescent Protein) peut former un exon supplémentaire avec à ses extrémités un site accepteur ou donneur d'épissage lorsqu'il est inséré dans intron d'un gène endogène (Kelso et al., 2004). Cette insertion permet la création d'une protéine fusion (protéine endogène-GFP) qui permet de suivre la localisation cellulaire et tissulaire de la protéine dans l'organisme. Il existe deux lignées de ce type qui nous ont permis de montrer que FER1HCH (FER1HCH -GFP) était exprimée dans les hémocytes de la larve (lignée G00237 et G00188) (Fig. IV.2). Au cours de la réponse immunitaire, les hémocytes pourraient rapidement sécréter la ferritine dans l'hémolymph, ce qui reste à démontrer.

2. PSLR une nouvelle protéine de la réponse immunitaire ?

Virginie Ribaud, au cours de son DEA, a participé à l'étude du gène CG6014 codant une protéine à domaine lectine-C. Par Northern blot, elle a confirmé que l'apport du facteur Gal4 permettait la surexpression du gène CG6014 (Fig. IV.3).

Figure IV. 3 : Vérification par Northern blot de la surexpression de CG6014 (lignée UY1631) sous le contrôle de da-Gal4

L'insertion en amont de CG6014 du transposon UY permet bien la surexpression de CG6014 en présence du facteur Gal4 (UY1631/da-Gal4 en noir) par rapport au contrôle (da-Gal4/+ en blanc) *RP49* (Ribosomal protein 49) sert de témoin interne.



La surexpression de CG6014 par da-Gal4 induit une légère résistance, néanmoins peu significative, des mouches aux infections par piqûre septique par PAO ($P < 0,05$) (Fig. IV.4 A). Des résultats préliminaires montrent aussi une légère résistance aux infections par ingestion lorsque CG6014 est sous le contrôle de da-Gal4 ou *srp-Gal4*, ces derniers points restent à confirmer. Par contraste, l'insertion seule est sensible aux infections par piqûre septique (Fig. IV.4 B) et aux infections naturelles (Tab. IV.4). Ces résultats démontrent un rôle de CG6014 dans la réponse immunitaire. L'élément P induit probablement une perte de fonction du gène CG6014 qui doit être confirmée par Northern blot.

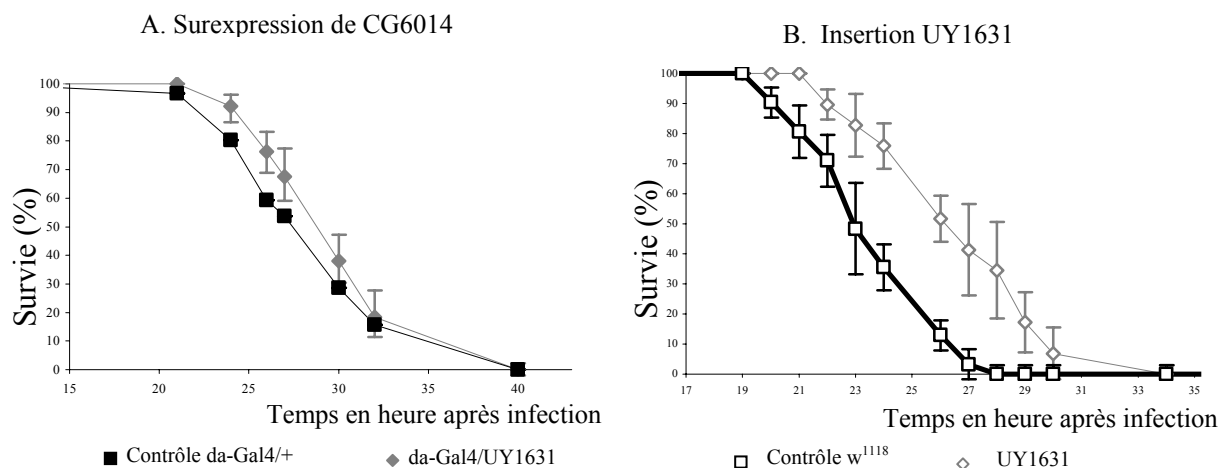


Figure IV. 4 : Effet de la surexpression de CG6014 ou de l'insertion UY1631 sur la résistance aux infections par piqûre septique par PAO1.

A : surexpression de CG6014 (da-Gal4/UY1631, losange gris), la surexpression rend les mouches légèrement plus résistantes aux infections par PAO1 que les individus contrôles (da-Gal4/+, carré noir) (infection de 100 individus) ($P < 0,05$).

B : insertion de UY1631 (UY1631, losange vide gris), l'insertion rend les mouches plus sensibles aux infections par PAO1 que les individus contrôles (*w*¹¹¹⁸, carré vide noir), l'insertion UY1631 induit probablement une perte de fonction du gène CG6014 ($P < 0,01$).

Par une approche de Northern blot, Virginie Ribaud a également observé que la surexpression de CG6014 n'agit pas sur la synthèse des peptides antimicrobiens, en absence d'infection. Par contre, la transcription de *sulf1*, un gène cible de la voie des JNK, est légèrement augmentée (Fig. IV.5). CG6014 pourrait jouer un rôle dans l'activation de la voie des JNK. Le rôle de CG6014 sur l'activation des voies NF- κ B et JNK au cours des infections reste à déterminer. Ce résultat reste néanmoins à confirmer.

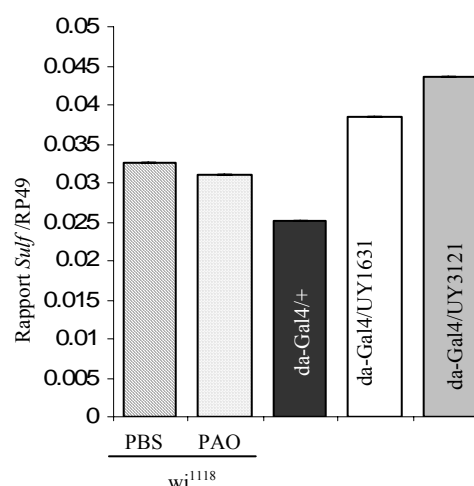
Figure IV. 5 : Etude par Northern blot de l'effet de la surexpression de CG6014 et de la dérégulation la GMPc kinase sur l'activation de la voie des JNK en absence d'infection en mesurant l'activation du gène cible *sulf1*.

contrôles w^{1118} : activation de la voie des JNK huit heures après piqûre septique soit avec du PBS stérile (en gris hachuré) ou par piqûre par PAO1 (points gris) Contrôle non infecté da-Gal4/+ (noir). La piqûre septique par le PBS ou PAO n'a pas d'effet significatif sur l'expression de *sulf*.

Effet de la surexpression de CG6014 (UY1631) sur l'expression de *sulf1* (blanc), la surexpression de CG6014 induit une légère activation de la transcription de *sulf1*.

Effet de la surexpression de GMPc kinase (UY3121) sur l'expression de *sulf1* (gris clair), la surexpression de CG6014 induit une légère activation de *sulf1*.

RP49 sert de témoin interne.



➤ Structure et fonction possible du gène CG6014

Le gène CG6014 code une protéine de 800 acides aminés ayant un domaine lectine-C entre les acides aminés 80-192. La partie N-terminale possède un peptide signal (aa 1-23) (<http://www.expasy.org/>). La protéine possède une hélice prédite comme transmembranaire en N-terminal (aa 13-26) permettant son insertion dans la membrane (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

L'orientation de la protéine dans la membrane n'a pas pu être déterminée précisément par bioinformatique (<http://www.predictprotein.org/>). La queue C-terminale peut être intracellulaire, car elle possède une séquence NLS (Nuclear Localization Sequence). Le domaine lectine situé lui aussi dans la grande partie C-terminale suggère au contraire une localisation extracellulaire, il pourrait alors jouer un rôle de reconnaissance des pathogènes.

Nous avons recherché par BLAST les protéines ayant la plus forte homologie avec le domaine lectine et la protéine CG6014 entière. Le maximum de conservation se trouve dans

le domaine lectine-C, le reste est beaucoup plus divergent. L'orthologue le plus proche est le gène CTL6 de l'anophèle qui possède aussi un domaine lectine-C et une séquence NLS (Inparanoid : <http://inparanoid.cgb.ki.se/>). Il n'existe pas de gène orthologue évident chez les mammifères. La protéine la plus proche est le précurseur de la lithostatine $\beta 1$. CG6014 a aussi des similarités de séquence par son domaine lectine avec des récepteurs à domaine lectine des cellules de la réponse immunitaire tels que les Natural killer, macrophages (McGreal et al., 2004)... Les domaines lectines fonctionnent comme un module de liaison au carbohydrates dépendant du calcium ou CRDs (**C**arbohydrate-**R**ecognition **D**omains) comme par exemple le mannose. Chez les mammifères, elles sont impliquées dans l'organisation de la matrice extracellulaire, dans l'activation du complément et dans la reconnaissance des pathogènes et dans les interactions cellule-cellule (McGreal et al., 2004).

Chez la drosophile, l'*hémolectine*, les deux lectines-C *lectine-28C*, *lectine-24Db* et la *galectine* sont exprimées dans les hémocytes, l'expression dans les cellules sanguines diminuant après infection de la larve pour les trois dernières (*lectine-28C*, *lectine-24Db* et la *galectine*) (Irving et al., 2005).

Nous avons décidé de nommer la protéine codée par CG6014 en fonction de son phénotype et de la présence du domaine lectine, PSLR (**P**seudomonas **S**ensitive **L**ectin **R**eceptor). PSLR pourrait aussi être une cible de la voie Ras dans les hémocytes. En effet, la surexpression de Ras dans la lignée hémocytaire provoque leur surprolifération et l'activation de nombreux gènes dont *PSLR* (Asha et al., 2003). Le gène CG6014 est aussi induit dans les cellules de la lignée mbn2 de type hémocyte après stimulation par du LPS (Johansson et al., 2005). Les voies de signalisation et les processus cellulaires contrôlés par PSLR restent à déterminer. Les premiers résultats suggèrent un rôle de PSLR dans le contrôle de la voie des JNK. Par homologie avec les autres protéines à domaine lectine, PSLR pourrait être un récepteur ou un corécepteur des bactéries.

3. Implication de la GMPc-kinase dans la réponse immunitaire

Nous nous sommes intéressées, avec Virginie Ribaud, à la GMPc kinase codée par le gène *foraging (for)* (UY3121). La guanyl cyclase est activable par le NO ce qui permet la cyclisation du GMPc. Le GMPc se comporte alors comme un activateur de la GMPc kinase. Le NO est lui-même impliqué dans la réponse immunitaire ce qui suggère un rôle possible de la GMPc kinase dans l'immunité chez la mouche. Parallèlement, j'ai observé que la

surexpression de la GMPc kinase supprime les phénotypes associés à l'expression d'ExoSGAP dans l'aile et dans l'œil, mettant en évidence un rôle de la GMPc kinase sur ou en aval des Rho GTPases.

Nous n'avons pas pu observer un effet reproductible de la dérégulation de la GMPc sur la résistance aux infections par piqûre septique. Nous ne sommes pas encore définitivement fixés sur l'effet d'une perte partielle de fonction sur la sensibilité aux infections par ingestion ou par piqûre septique. Il existe un mutant disponible de la GMPc kinase, le mutant *for1* qui est létal et qui semble ne pas présenter une sensibilité aux infections à l'état hétérozygote. Il est possible que la mutation « perte partielle de fonction » ou la surexpression du gène ne soit pas suffisante pour avoir un phénotype en cas d'infection par un pathogène virulent. D'autres bactéries moins pathogènes devraient être testées.

Dans un premier temps, Virginie Ribaud a montré par Northern blot, que la surexpression GMPc kinase avec l'inducteur da-Gal4 n'active pas la transcription de la diptéricine en absence d'infection (résultat non montré). La GMPc kinase seule ne suffit pas à l'activation de la voie Imd. Par contraste, la transcription de *sulf1* augmente légèrement dans ces conditions suggérant un rôle GMPc kinase éventuel dans l'activation de la voie des JNK (Fig. IV.5).

Nous allons rechercher à définir son rôle en évaluant l'activation des voies de signalisation de la réponse immunitaire plus particulièrement les voies Imd et JNK en contexte de surexpression et de perte partielle de fonction avec ou en absence d'infection.

4. Implication d'une ubiquitine protéase dans la régulation de la voie Imd

Suite à la première série de test, nous avons retenu la lignée UY1507 qui permet la dérégulation d'une ubiquitinase dUBP (CG5505). La protéine CG5505 possède des orthologues chez les mammifères.

Marie Gottar a pris charge la caractérisation de ce gène *in vivo*, elle a montré par Northern blot, que dUBP est surexprimée dans la lignée UY1507. Elle a aussi construit des lignées transgéniques UAS-CG5505. La surexpression de CG5505 avec les lignées UY1507 et UAS-CG5505 diminue l'induction de la diptéricine après infection des adultes (résultats non montrés).

Dominique Thévenon a pris en charge l'étude de CG5505 par une approche de RNAi en cellules S2. Elle a montré que l'absence d'expression de CG5505 augmente fortement l'expression de l'attacine après stimulation des cellules par le LPS.

CG5505 intervient donc de façon manifeste dans la régulation de la voie Imd probablement par l'intermédiaire de son activité ubiquitine protéase et confirmant le rôle de l'ubiquitination dans la régulation des voies de signalisation.

III. Conclusion

Ce crible a permis de mettre en évidence un certain nombre de gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Nous avons utilisé une approche par mutagenèse gain de fonction qui a des limites. En particulier le phénotype de survie est difficile à cribler, les écarts de sensibilité sont en général faibles. La souche PAO1, étant très virulente, les différences de sensibilité peuvent être masquées, les infections naturelles ou par piqûre septique avec des souches moins virulentes permettraient de mieux apprécier les différences.

Cependant nous avons réussi à sélectionner quelques lignées candidates qui semblent impliquées dans la réponse immunitaire. Nous avons choisi de nous focaliser sur l'étude de quelques uns de ces candidats dont la fonction pouvait laisser à penser qu'ils avaient un rôle dans la réponse immunitaire. Ils vont aussi être de nouveau testés pour leur sensibilité à d'autres types d'infections (bactéries à Gram positif ou négatif).

Nous avons d'ores et déjà pu mettre en évidence l'implication d'un certain nombre de gènes qui n'avaient pas encore été identifiés comme étant des éléments de la résistance au stress infectieux notamment PSLR et Fer1HCH, Enabled, dUBP2... Leur étude devrait permettre de comprendre leur fonction dans la réponse immunitaire et d'identifier de nouveaux éléments des voies de signalisation de la réponse immunitaire.

Dans l'ensemble des lignées sélectionnées pour ces tests, il n'existe pas de corrélation positive entre réponse au stress oxydant et stress infectieux. Des lignées résistantes au stress infectieux peuvent être résistantes au stress oxydant (Tab. IV.2), tandis que d'autres sont sensibles (Tab. IV.3). L'ingestion de paraquat ou d'H₂O₂ induit une réponse anti-oxydante pour permettre l'élimination des espèces réactives toxiques. Le stress infectieux induit aussi une production d'espèces réactives de l'oxygène qui ont rôle important dans l'élimination des pathogènes. Il doit donc exister une balance entre la production de dérivés de l'oxygène et les mécanismes anti-oxydants (Ha et al., 2005). Cette régulation expliquerait la corrélation inverse ou l'absence de corrélation que l'on peut observer.

Tableau IV. 2 : Gènes candidats dont la dérégulation permet une meilleure résistance aux infections par PAO1 par piqûre septique

souches	Gènes à proximité	Site insertion par rapport au gène	Sens de l'insertion	Position cytologique	Sensibilité aux infections : avec da Gal4	Sensibilité stress oxydant (Dr. H. Tricoire, Communication personnelle)	fonction
Résistance aux stress oxydants (Dr. H. Tricoire communication personnelle)							
• UY109	CG8732 <i>l(2)44Dea</i>	à 4109 pb de l'ATG	Bon sens	44D4	Légère résistance (2 tests sur 4)	Résistance H ₂ O ₂ et paraquat	Acyl-CoA synthétase, CoA ligase 3 métabolisme des acides gras
• UY1083	CG6199	Insertion 3 pb avant le début de transcription	Bon sens	68B1	Légèrement résistance (1 test)	Résistance H ₂ O ₂	Précurseur de la procollagène N-Lysine, 2-oxoglutarate dioxygénase (Lysyl hydroxylase) métabolisme protéique
• UY1135	CG8589	A 5246 pb en amont du début du gène CG8589	Sens inverse	50F1	Résistance (2 tests sur 3)	Résistance forte H ₂ O ₂	CG8589 : fonction inconnue (domaine tudor)
	CG13942	A 585 pb en amont du cDNA LP13775 correspondant au gène CG13942	Bon sens	50F4			CG13942 : fonction inconnue
• UY1358	CG11739	180 pb en amont du gène	Mauvais sens	82A5	Résistance (1 test)	Résistance forte paraquat	Porteur tricarboxylate (Sideroflexine 1)
• UY1631	CG6014	15 à 40 pb en amont des cDNA	Bon sens	78C9-D1	Légère résistance	Résistance paraquat	Protéine membranaire à domaine C-lectine
• UY1726	CG14821	126 pb en amont du cDNA GH12583 correspondant au gène	Sens inverse	65D5	Résistante (1 test)	Résistance forte H ₂ O ₂	Pas d'homologue

Les informations sur les sites d'insertions des éléments UY ont été communiqué par le Dr H. Tricoire. La fonction des gènes associés correspond à celle fournis par flybase ou par la recherche de motifs protéiques par BLAST.

Tableau IV.2 (suite) : Gènes candidats dont la dérégulation permet une meilleure résistance aux infections par PAO1 par piqure septique

souches	Gènes à proximité	Site insertion au gène	Sens de l'insertion	Position cytologique	Sensibilité aux infections : avec da Gal4	Sensibilité stress oxydant (Dr. H. Tricoire)	Fonction
Résistance aux stress oxydants (Dr. H. Tricoire communication personnelle)							
• UY1780	CG11452 <i>Tenascin major (Ten-m)</i>	à 509 pb en amont du gène		7D4-E3	Résistance (2 tests sur 3)	Résistance H ₂ O ₂	odd Oz protein (odz), protéine type tencine protéine de la matrice extracellulaire, adhésion et forme cellulaire (gène de type <i>pair rule</i>)
• UY2299	CG8583	64 pb en amont du gène		65F7	Légère résistance	Résistance forte H ₂ O ₂	protéine transmembranaire du Réticulum endoplasmique pour le ciblage protéique Homologue humain de la protéine de translocation SEC63
• UY3171	CG6603 <i>Hsc70CB</i>	6 pb en aval du début de transcription de CG6603	Sens inverse	70C15	Résistance (2 tests)	Résistance forte paraquat et H ₂ O ₂	HSP 70 Heat Shock protein, réponse au stress
• UY52	–	ND	–	–	Résistance (1 test)	Résistance au paraquat	–
• UY815	–	ND	–	–	Résistance (1 test)	Résistance H ₂ O ₂	–
• UY1535	–	ND	–	–	Résistance (1 test)	Résistance H ₂ O ₂	–
Sensibilité aux stress oxydants (Dr. H. Tricoire communication personnelle)							
• UY1188	CG11079	Insertion dans le second intron	Sens inverse	59D8	Résistante (1 test)	Sensibilité forte paraquat	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase
• UY1771	<i>ThdI</i>	Insertion 88 pb en amont de l'unité de transcription	Sens inverse	102C2	Légère résistance	Sensibilité forte paraquat	G/T-mismatch-specific-thymine-DNA-glycosylase
• UY2006	CG7753 <i>meiotic W68 (mei-w68)</i>	566 pb en aval du début de transcription	Bon sens	56D9	Résistante (1 test)	Sensibilité forte H ₂ O ₂	Liaison à l'ATP, topoisomérase

Tableau IV.2 (suite) : Gènes candidats dont la dérégulation permet une meilleure résistance aux infections par PAO1 par piqure septique

souches	Gènes à proximité	Site insertion au gène	rapport	Sens de l'insertion	Position cytologique	Sensibilité aux infections : avec da Gal4	Sensibilité stress oxydant (Dr. H. Tricoire)	Fonction
Sensibilité aux stress oxydants (Dr. H. Tricoire communication personnelle)								
• UY1894	CG1814	Dans le premier intron du gène CG1814		Sens inverse	45F4	Résistance (1 test)	Sensibilité H ₂ O ₂	Fonction inconnue
	CG1874	103 pb en aval du début de transcription du gène CG1874						
• UY3008	CG30023 <i>sprite (sprt)</i>	13 pb en aval du cDNA GH21160 du gène CG30023		Sens inverse	47F8	Résistance (2 tests sur 4)	Sensibilité paraquat	CG30023 : fonction inconnue séquence PDZ quelques homologies avec une phosphatase
	CG30022	Perturbe peut être le CG30022						CG30022 : Hydroxyacyl glutathion hydrolase : défense, métabolisme de l'O ₂ et des espèces réactives de l'oxygène, réponse aux toxines
• UY20 ou UY 26	-	ND		-	-	Résistance (2 tests)		-

Tableau IV. 3 : Gènes candidats dont la dérégulation induit une sensibilité aux infections par PAO1 par piqûre septique

souches	Gènes à proximité	Site insertion par rapport au gène	Sens de l'insertion	Position cytologique	Sensibilité aux infections : avec da Gal4	Sensibilité stress oxydant (Dr. H. Tricoire)	Fonction (d'après flybase)
Résistance aux stress oxydants (Dr. H. Tricoire communication personnelle)							
• UY124	CG7319	Dans le premier exon	Bon sens	68D2	Sensible (1 test)	Résistance H ₂ O ₂	rRNA(adenine)methyl-transférase
• UY1112	CG17146 <i>Adenylate kinase (Adkl)</i>	493 pb en amont du début de transcription	Sens inverse	69A2	0 à légèrement sensible (3 tests sur 5)	Résistance paraquat	Adénylate kinase 1 rôle dans le métabolisme et l'homéostasie cellulaire
• UY1170	CG7734 <i>schurri (shn)</i>	3490 pb en amont	Sens inverse	47D6-E1	Sensible (2 tests)	Résistance H ₂ O ₂	Facteur de transcription à doigt de Zn
• UY2535	CG16718	Insertion 11 pb en aval du début de transcription	Sens inverse	92A13	Sensible (1 test)	Résistance forte paraquat	Fonction inconnue, quelques homologues avec la protéine transmembranaire 16B et 16C humaine, DUF 590
• UY2658	CG10064	Dans le dernier exon du gène	Sens inverse	65D5	Sensible (1 test)	Résistance paraquat	Signature de protéine G à domaine répété WD40 Famille des transducines
• UY2828	CG11836	372 pb en aval du début de transcription et 275 pb en amont de l'ATG		96B10	Sensible (1 test)	Résistance paraquat	Sérine-type endopeptidase, trypsine
• UY1106	—	ND	—	—	Sensible (1 test)	Résistance paraquat	—
• UY63	—	ND	—	—	Sensible (1 test)	Résistance au paraquat	—
• UY1312	—	ND	—	—	Sensible (1 test)	Résistance paraquat	—
• UY1693	—	ND	—	—	Sensible (1 test)	Résistance paraquat	—
• UY2019	—	ND	—	—	Faible sensibilité	Résistance H ₂ O ₂	—
					Sensibilité (1 test)	Résistante H ₂ O ₂	—

Tableau IV.3 (suite) : Gènes candidats dont la dérégulation induit une sensibilité aux infections par PAO1 par piqûre septique

souches	Gènes à proximité	Site insertion par rapport au gène	Sens de l'insertion	Position cytologique	Sensibilité aux infections : avec da Gal4	Sensibilité stress oxydant (Dr. H. Tricoire)	fonction
Résistance aux stress oxydants (Dr. H. Tricoire communication personnelle)							
•UY3026	–	ND	–	–	Sensibilité (2 tests sur 3)	Résistance H ₂ O ₂	–
•UY3062	–	ND	–	–	Faible sensibilité (1 test)	Résistance paraquat	–
•UY3182	–	ND	–	–	Sensibilité (1 test)	Résistance paraquat	–
Sensibilité aux stress oxydants (Dr. H. tricoire Communication personnelle)							
•UY753	CG13820	à 431 pb en aval du début du cDNA RE73615	Bon sens	95A7	Sensible (1 test)	Sensibilité forte paraquat	–
•UY1713	–	Aucune homologie et cDNA correspondant	–	–	Faible sensibilité (2 tests sur 3)	Sensibilité H ₂ O ₂	–
•UY1852	–	ND	–	–	Sensibilité (1 test)	–	–

Tableau IV.4 : Exemples de quelques tests complémentaires sur des gènes candidats

Lignées	Tests effectués
UY569 (<i>enabled</i>)	-Insertion : sensible aux infections naturelles par PAO1 et non sensible aux infections par piqûre septique par <i>E. faecalis</i> (1test).
UY1102 (<i>fer1HCH</i>)	-Insertion : sensible aux infections naturelles par PAO1(2 tests) et non sensible aux infections par piqûre septique par <i>E. faecalis</i> (1test).
UY1507 (CG5505)	- Insertion : légère sensibilité aux infections naturelles par PAO1 (1 test).
UY1631 (CG6014)	-Insertion : sensibilité aux infections naturelles par PAO1 (2 tests sur 3) et par piqûre septique (1 test), mais pas aux infections par piqûre septique par <i>E. faecalis</i> (1 test). - surexpression dans les hématocytes avec srp Gal4 : légère résistance aux infections naturelles (1 test).

PARTIE IV

CONCLUSION GENERALE

ET

PERSPECTIVES

P. aeruginosa est capable d'infecter des organismes variés en utilisant les mêmes facteurs de virulence. Parmi, ceux-ci, le système de sécrétion de type III est un système efficace qui permet l'injection directement dans le cytoplasme de la cellule hôte de toxines bactériennes dont l'exoenzyme S. Les mécanismes de régulation de ce système de sécrétion et de contrôle de formation du pore au niveau de la membrane de la cellule hôte sont étudiés au laboratoire (Dr I. Attrée et Dr S. Elsen). Avant mon arrivée, il avait été montré que le système de sécrétion de type III participe à la virulence de la bactérie chez la drosophile (Fauvarque et al., 2002).

➤ **La drosophile comme modèle d'étude des facteurs de virulence bactériens.**

Mon travail de thèse s'inscrit dans ce contexte. Il s'agissait de créer et d'utiliser des lignées de drosophiles transgéniques pour permettre la caractérisation fonctionnelle des toxines de type III et de comprendre leur effet sur la réponse immunitaire *in vivo*. Je me suis plus particulièrement intéressée au domaine GAP de l'exoenzyme S de *P. aeruginosa* en utilisant des lignées transgéniques de drosophiles permettant l'expression tissu-spécifique d'ExoSGAP.

J'ai tout d'abord confirmé l'effet inhibiteur d'ExoSGAP sur l'activité des Rho GTPases. J'ai ensuite mis en évidence le rôle d'ExoSGAP sur la réponse immunitaire de la mouche : ExoSGAP affecte plus particulièrement la réponse immunitaire cellulaire en inhibant la phagocytose. Pour aller plus loin sur la caractérisation de la toxine, j'ai recherché des modificateurs du phénotype associé à l'expression d'ExoSGAP dans l'œil et j'ai ainsi identifié de nouvelles cibles potentielles de la toxine. Ces gènes modificateurs sont actuellement en cours de caractérisation.

Nous avons pu ainsi valider l'utilisation de la drosophile comme modèle d'étude des toxines de type III.

Des approches similaires sont utilisées dans d'autres laboratoires, pour la caractérisation de protéines virales ou bactériennes. Des systèmes équivalents d'expression inductible de facteurs non eucaryotes ont déjà été utilisés pour l'étude des protéines du virus du HIV (**H**uman **I**mmunodeficiency **V**irus-1) à savoir Tat, VPU (**V**iral **P**rotein **U**) et plus récemment la protéine Nef (Battaglia et al., 2001; Leulier et al., 2003; Lee et al., 2005b). Cette technique a permis de mettre en évidence un effet de VPU ou de Nef sur l'activation de la réponse immunitaire dépendante de la voie Toll ainsi que le rôle de Nef dans l'induction de

l'apoptose dépendante de la voie des JNK (Leulier et al., 2003; Lee et al., 2005a). Le laboratoire du Dr N. Silverman a développé un système similaire pour l'étude de la toxine bactérienne de type III de *Yersinia pestis*, YopJ, une protéine à activité de type ubiquitine protéase (44th Drosophila conference 2004, Washington D.C, poster). La drosophile se révèle donc un bon modèle pour l'étude de la contribution des protéines virales et bactériennes dans la virulence de pathogènes dans un organisme entier (Vodovar et al., 2004).

D. melanogaster peut être infectée et être sensible à différents pathogènes responsables d'infection chez l'homme. Elle peut servir ainsi à comprendre certains des processus utilisés par ces agents infectieux pour échapper aux mécanismes de défense de l'hôte. *Drosophila melanogaster* peut aussi être sensible à d'autres bactéries à développement intra- ou extra-cellulaire, comme par exemples *Listeria monocytogenes* (Mansfield et al., 2003), *Staphylococcus aureus* (Lemaitre et al., 1997; Needham et al., 2004), *Mycobacterium marinum* (Dionne et al., 2003), *Salmonella enterica* (Brandt et al., 2004).

➤ La réponse de la drosophile aux infections par *P. aeruginosa*

Les infections par les souches de *P. aeruginosa*, PAO1 ou CHA, induisent une très forte réponse antimicrobienne (Fauvarque et al., 2002). Les membres du laboratoire du Pr L. Rahme ont au contraire montré que lors d'une infection par la souche PA14, l'expression des divers peptides antimicrobiens diminue, cette diminution est probablement due à certains facteurs de virulence de la bactérie (Apidianakis et al., 2005). Ceci montre l'existence de différences de virulence entre les souches bactériennes chez la drosophile. Comme cela a déjà été montré d'autres modèles d'infections comme par exemple les cultures cellulaires et les souris, où différentes souches bactériennes induisent des effets différents sur les cellules ou dans l'organisme.

J'ai aussi observé que les souches CHA et PAO1 étaient capables d'infecter les mouches par voie naturelle (ou par ingestion) et de conduire à la mort de leur hôte en une semaine environ. Il existe peu de pathogènes capables d'infecter et de tuer les drosophiles au cours de ce type d'infection. En effet, *Erwinia carotovora* ssp. n'affecte pas la survie de larves sauvages mais elle induit la production de peptides antimicrobiens par les épithélia en contact avec le pathogène. Et surtout, elle active la réponse systémique par le corps gras par une voie NO dépendante (Basset et al., 2000; Foley et O'Farrell, 2003; Tzou et al., 2000).

Récemment, il a été décrit une nouvelle espèce de bactéries à Gram négatif qui est un pathogène naturel de la mouche : il s'agit de la bactérie *Pseudomonas entomophila*. Cette bactérie, capable d'induire une réponse immunitaire de l'hôte, est pathogène pour les mouches adultes et les larves lors d'infection par ingestion. *P. entomophila* est capable de persister dans l'intestin et conduit à la destruction de la structure intestinale (Vodovar et al., 2005). Dans cette étude, les auteurs ont testé l'effet des infections par ingestion de diverses souches de *Pseudomonas* chez des larves de drosophiles. Quelques souches bactériennes sont capables d'induire la diptéricine, mais seule la souche *P. entomophila* est pathogène. En particulier, la souche PAO1 que nous utilisons au laboratoire, induit une légère activation de la diptéricine mais elle n'affecte pas la survie des larves aux infections dans ces conditions expérimentales (Vodovar et al., 2005). Les individus adultes que nous utilisons pour l'infection, paraissent moins résistants que les larves aux infections par CHA ou PAO : les mouches adultes meurent en environ une semaine. Une autre étude avait montré une virulence faible ($\approx 65\%$ de survie en 14 jours) de la souche PAO1 au cours d'infection naturelle chez l'adulte (Chugani et al., 2001). Cette différence de pathogénicité de la souche PAO1 est probablement due à des différences de conditions expérimentales : nous utilisons des mouches adultes et nous utilisons des cultures à une DO_{600nm} finale de 0,2 ($4,8 \cdot 10^8$ bactéries pour 2 ml de sucrose 5%) en phase exponentielle de croissance. Alors que dans une autre étude, les adultes ont été élevés en présence de $8 \cdot 10^9$ bactéries issus de culture en phase stationnaire dans 170 μ l de sucrose 5% (Chugani et al., 2001).

La différence de phase de croissance des bactéries peut aussi expliquer des différences de sensibilité ; les souches que nous utilisons sont en phase exponentielle de croissance et pourraient être plus virulentes que des bactéries en phase stationnaire, notamment grâce à une activation plus rapide du système de sécrétion de type III dans ces conditions. Cette hypothèse pourrait être testée en comparant la cinétique de survie des mouches infectées par voie naturelle en utilisant des cultures en phase exponentielle ou en phase stationnaire. Nous pouvons aussi infecter des mouches avec la souche sauvage ou avec la souche déficiente pour le système de sécrétion de type III CHA::*exsA*, pour évaluer l'implication du système de sécrétion de type III dans la virulence bactérienne.

➤ **ExoSGAP cible les Rho GTPases et inhibe la réponse immunitaire**

Les lignées transgéniques P[UAS-ExoSGAP], nous ont permis d'étudier, comme décrit précédemment, l'effet d'ExoSGAP sur la réponse immunitaire innée de la drosophile. Je me

suis alors intéressée à définir le rôle des différentes Rho GTPases, que nous avons montrées comme étant inhibées par le domaine GAP d'ExoS *in vivo*, au cours de la réponse immunitaire de l'hôte. J'ai plus particulièrement étudié la GTPase Rac2, dont la mutation, parfaitement viable au stade adulte, montre un phénotype reproductible de sensibilité aux infections par *P. aeruginosa* au contraire des autres mutants de Rho GTPases.

J'ai observé que le mutant *Rac2^d* ou les mouches exprimant ExoSGAP soit de façon ubiquiste soit dans les hémocytes sont sensibles aux infections bactériennes aussi bien par des bactéries à Gram négatif qu'à Gram positif. Ceci suggère que les Rho GTPases n'interviennent pas ou peu dans les mécanismes de défense spécifique d'une classe de pathogène mais plus particulièrement dans des processus généraux de défense.

L'expression d'ExoS GAP n'affecte pas la réponse humorale : l'activation des peptides antimicrobiens Imd/Relish-dépendante et la transcription du *puc*, un gène cible de la voie des JNK, sont normales. De plus, la survie des mouches exprimant ExoSGAP dans le corps gras n'est pas modifiée en cas d'infection par *P. aeruginosa*. De même, la mutation *Rac2^d* n'affecte pas ou peu l'expression des peptides antimicrobiens après infection par des bactéries à Gram négatif ou positif. Néanmoins, j'ai observé une légère augmentation de la transcription de la drosomycine en réponse à l'infection par PAO1.

Au cours de l'infection par piqûre septique par *P. aeruginosa*, je n'ai pas observé une activation précoce de la voie des JNK, comme cela a été décrite dans la littérature, après introduction par piqûre septique de bactéries *E. cloecae* ou d'un mélange de bactérie *Micrococcus luteus* / *E. coli* dans l'hémocèle de la mouche (De Gregorio et al., 2001; Boutros et al., 2002; Park et al., 2004b). Comme nous infectons les mouches avec une faible multiplicité d'infection (50 à 100 bactéries suivant les expériences $DO_{600} = 0,4$), la concentration bactérienne utilisée n'est peut être pas suffisante pour induire fortement la voie des JNK. Une autre hypothèse est que nous avons utilisé *P. aeruginosa*, comme agent infectieux, au lieu de pathogènes moins virulents, or les facteurs de virulence de *P. aeruginosa* dont le système de sécrétion de type III pourraient avoir bloqué la voie des JNK.

Par contre, j'ai observé une activation tardive, jamais décrite dans la littérature, de la voie des JNK, 18 heures après l'infection, juste avant que les premières mouches commencent à mourir. A ce moment, il ne semble pas y avoir d'inter-régulation entre Relish et la voie des JNK comme décrit dans la littérature (Park et al., 2004b; Kim et al., 2005) : les gènes cibles des deux voies sont fortement exprimés. Cette hypothèse reste à confirmer en évaluant, l'activation tardive de la voie JNK chez un mutant de la voie Imd. Dix-huit heures après

l'infection, l'ensemble des mécanismes de défense est activé ce qui pourrait correspondre à un emballement de la réponse immunitaire qui n'arrive pas à éliminer les pathogènes.

Rac2 pourrait aussi réguler la voie des JNK au cours de la réponse : j'ai observé que la surexpression de Rac2 active la transcription de *puc*, par ailleurs l'activation tardive à 18 heures n'est pas toujours observable dans le mutant *Rac2^d*. Afin de mieux appréhender le rôle de Rac2 dans l'activation tardive de *puc*, il sera nécessaire d'évaluer l'activation de cette voie dans les heures précédant la mort des drosophiles *Rac2^d* et témoins. L'activation précoce de la voie des JNK après infection par *E. cloecae* ou par le mutant de *P. aeruginosa* CHA::*exsA* sera aussi mesurée au laboratoire, 30 min, une heure et quatre heures après infection. Ceci a pour but de tester le rôle de Rac2 dans cette l'activation rapide de la voie des JNK, ce qui n'a pas été mis en évidence suite aux infections par *P. aeruginosa*. L'utilisation du mutant CHA::*exsA* dans ce test permettra de s'affranchir du système de sécrétion de type III donc de la toxine ExoS qui pourrait affecter l'activation de la voie des JNK.

J'ai également montré que la réponse immunitaire cellulaire était plus particulièrement affectée chez les individus exprimant ExoSGAP ou les mutants *Rac2^d*. En effet, l'expression d'ExoSGAP par les hémocytes ou la présence de la mutation *Rac2^d* diminue la capacité de plasmotocytes à phagocyter des particules issues aussi bien de bactéries à Gram négatif que de bactéries à Gram positif : la phagocytose est diminuée de 40-45 % par rapport aux hémocytes témoins. Une hypothèse logique serait donc qu'ExoSGAP affecte la phagocytose en inhibant les Rho GTPases et principalement Rac2, ce qui perturberait la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine.

De nombreux autres résultats de la littérature sont en faveur d'un rôle prépondérant de la Rho GTPase Rac2 dans la réponse immunitaire et l'hématopoïèse. Rac2 est exprimée dans les hémocytes larvaires mais sa transcription n'est pas activée par l'infection (Irving et al., 2005). Des expériences sur puces à ADN ont montré l'activation de Rac2 en réponse aux infections dans les adultes (Boutros et al., 2002). En cellules S2, des expériences de RNAi ont montré que l'inactivation de *Rac2* double le nombre de cellules exprimant la diptéricine après stimulation par du LPS, suggérant un rôle régulateur de la protéine sur la transcription des peptides antimicrobiens en réponse aux infections (Foley et O'Farrell, 2004). Nous avons montré que les mutants *Rac2^d* sont sensibles aux infections par des bactéries à Gram négatif (PAO1, *E. cloecae*) et positif (*A. tumefaciens*, *E. faecalis*). Mais au contraire de ce qui a été

observé en culture cellulaire (Foley et O'Farrell, 2004), nous n'avons pas observé d'effet de la mutation de la GTPase sur l'expression de la diptéricine après infection.

Il est probable que Rac2 et ExoSGAP agissent aussi à d'autres niveaux dans la réponse immunitaire comme par exemple dans la régulation des JNK et dans la signalisation en aval de la GMPc kinase, ce qui est suggéré par les résultats obtenus sur les modificateurs du phénotype d'ExoSGAP.

Nous avons par ailleurs observé que les souches virulentes de *P. aeruginosa*, CHA et PAO1 tuent les mouches en approximativement une semaine au cours d'infection par ingestion. Les mouches exprimant ExoSGAP ainsi que les mutants *Rac2^d* sont nettement plus sensibles à ce type d'infection que les individus témoins. Au vu de l'implication de Rac2 dans la réponse immunitaire cellulaire et du rôle des hémocytes dans l'activation de la réponse humorale au cours de ce type d'infection (Basset et al., 2000; Foley et O'Farrell, 2003), il serait intéressant de quantifier l'effet de la mutation *Rac2^d* sur l'expression des peptides antimicrobiens dans ce contexte. Rac2 en plus de sa fonction dans la phagocytose pourrait réguler la sécrétion ou l'expression de protéines impliquées dans la signalisation vers le corps gras.

Par ailleurs, les Rho GTPases ont un rôle dans la structure des contacts cellule-cellule et dans le maintien des structures des épithélia (Braga, 2002). *Pseudomonas aeruginosa* comme c'est le cas pour *P. pneumophila* (Vodovar et al., 2005) pourrait perturber la structure de la barrière épithéliale, en partie par l'intermédiaire des toxines de type III pour faciliter l'invasion de la bactérie dans l'hémocèle de la mouche (Fig.ccl.1). Il serait intéressant de comparer la structure de l'épithélium intestinal entre de mouches infectées par ingestion de bactéries en phase exponentielle ou stationnaire, afin de tester l'effet du système de sécrétion de type III dans la structure épithéliale. L'implication des Rho GTPases dans la structuration des épithélia pourra être également testée en regardant la structure de l'épithélium intestinal chez le mutant *Rac2^d* et chez les mouches exprimant ExoSGAP ou Rac2 spécifiquement dans l'épithélium intestinal sous le contrôle de l'inducteur cad-Gal4.

Dans les neutrophiles et les macrophages des mammifères, l'élimination des pathogènes nécessite la production de dérivés de l'oxygène au niveau des vacuoles de phagocytose et au niveau membranaire. La production des espèces réactives de l'oxygène est assurée par la NADPH-oxydase (NOX2) dont l'activation dépend de Rac présente chez les

mammifères (Lambeth, 2004). Peu de données sont connues sur la production d'espèces réactives de l'oxygène au cours des infections bactériennes chez la drosophile.

Chez les insectes, il a été récemment décrit un équivalent de NOX2 chez *Galleria mellanolla* (Bergin et al., 2005). Chez la drosophile, il existe deux gènes codant des NADPH-oxydases : CG3131 code une protéine de type DUOX et CG3896 code une protéine possédant des similarités avec la protéine NOX5 des mammifères. Les produits de ces deux gènes sont des candidats pour la production d'espèces réactives de l'oxygène chez la drosophile. De façon similaire à l'activation de NOX2 par Rac1 ou Rac2 chez les mammifères, les protéines DUOX et NOX de la drosophile pourraient être régulées par Rac2. J'ai commencé la mise au point de tests en cellules S2 afin de voir s'il existe une production d'ions superoxydes NADPH-oxydase dépendante au cours de l'infection et si elle est régulée par les protéines de type Rac dont Rac2.

➤ Rôle de Rac2 dans l'hématopoïèse

Nous n'avons observé aucun effet de l'expression du domaine GAP d'ExoS sur la différenciation des différentes classes d'hémocytes. Il se peut que les Rho GTPases soient peu impliquées dans l'hématopoïèse ou que le niveau d'expression de la toxine ne soit pas suffisant pour inhiber complètement l'activité des Rho GTPases. En effet plusieurs données sont en faveur d'un rôle des Rho GTPases dans la l'hématopoïèse. Par exemple, les guêpes femelles *Leptopilina boulardi* issues de souches virulentes injectent dans les larves de drosophiles des facteurs supprimant la réponse des lamellocytes dont la protéine P4. P4 est une protéine présentant 50% de similarités avec les RhoGAPs, qui affecte spécifiquement la différenciation et la morphologie des lamellocytes (Labrosse et al., 2005a; Labrosse et al., 2005b). Des résultats de la littérature suggèrent un rôle de Rac1 probablement par l'intermédiaire des JNK dans la différenciation lamellocytaire (Zettervall et al., 2004).

J'ai aussi remarqué que les hémocytes isolés de larves mutantes *Rac2^d* au stade L3 apparaissent souvent moins nombreux et présentent régulièrement des défauts morphologiques : les conditions exactes d'obtention de ces phénotypes restent cependant à déterminer. Le mutant *Rac2^d* présente aussi une diminution du nombre de cellules à cristaux par rapport aux larves L3 témoins *Rac2^{d/+}*, néanmoins le nombre de cellules à cristaux varie entre les individus. Je dois donc confirmer ce résultat.

➤ **Recherche de nouvelles cibles et voies de signalisation perturbées par ExoSGAP et susceptibles d'avoir un rôle dans la réponse immunitaire**

L'expression du domaine GAP d'ExoS dans des organes non vitaux comme l'aile ou l'œil, induit des défauts morphogénétiques qui m'ont servi de point de départ pour rechercher des gènes endogènes dont la dérégulation modifie le phénotype associé à la toxine. Nous espérons ainsi identifier de nouvelles cibles de la toxine *in vivo*.

J'ai testé diverses lignées de drosophiles mutantes pour des gènes impliqués dans la réponse immunitaire, la réponse au stress oxydant ou les voies régulées par RacGAP(84C). Plusieurs gènes candidats ont ainsi été isolés. D'ores et déjà, certains résultats montrent que l'expression de certains des gènes candidats est modifiée au cours de la réponse immunitaire comme par exemple *Myo3IDF* (Boutros et al., 2002; Asha et al., 2003), des gènes codant des protéines de type LITAF (Irving et al., 2005)... Dans les cellules S2, la protéine MESR4 que nous avons identifiée comme suppresseur du phénotype d'ExoSGAP chez la drosophile, est impliquée dans l'inactivation de la voie Imd et dans la morphologie cellulaire (Foley et O'Farrell, 2004).

La mutation *Rac2^d* ou l'expression d'ExoSGAP diminue la capacité des macrophages à phagocyter. Ceci peut s'expliquer par un effet sur l'actine : ExoSGAP interagit avec diverses protéines associées au cytosquelette d'actine, plus particulièrement avec CDI (Center Divider/ TESK1). CDI est une protéine de la famille des LIM kinases qui interviennent dans la stabilité du cytosquelette d'actine par phosphorylation de la cofiline (Ohashi et al., 2000). Les effets sur la phagocytose que nous avons observés sont probablement liés à un défaut de contrôle de la dynamique de l'actine associée à l'inhibition des Rho GTPases dont Rac2.

ExoSGAP pourrait aussi agir sur d'autres protéines régulatrices du cytosquelette d'actine comme dSCAR qui peut être régulée en grande partie par les Rho GTPases et qui est également impliquée dans la phagocytose des bactéries par les hémocytes (Pearson et al., 2003; Rogers et al., 2003). Une autre cible d'ExoSGAP pourrait être la protéine Enabled. En effet, nous avons montré que l'insertion d'un élément P[UY] à 404 pb en aval du gène *enabled* rend les mouches sensibles aux infections par ingestion. Chez les mammifères, les protéines Ena/VASPs sont impliquées dans la phagocytose et sont régulées par les Rho GTPases (Coppolino et al., 2001) : cette fonction pourrait être conservée chez la drosophile.

Il semble qu'il existe des interactions possibles entre ExoSGAP et la voie Toll ou la voie Imd, bien qu'aucun effet important sur l'expression des peptides antimicrobiens n'ait été

mis en évidence chez le mutant *Rac2^d* ou chez les mouches exprimant ExoSGAP au cours de l'infection par *P. aeruginosa* ou *E. faecalis* (pour *Rac2*). Néanmoins, chez le mutant *Rac2^d*, l'infection par PAO1 sur-active légèrement mais significativement la voie Toll. Ce dernier résultat reste à confirmer.

J'ai surtout observé un effet sur le phénotype induit par ExoSGAP, de gènes codant des protéines des voies de signalisation susceptibles d'impliquer les JNK. J'ai par exemple observé une interaction possible avec des éléments de voie de signalisation, dont *Traf1* pouvant conduire vers l'apoptose (Kuranaga et al., 2002; Cha et al., 2003).

Le crible a été effectué sur un critère phénotypique morphogénétique. Le rôle de ces gènes dans la réponse immunitaire reste donc à déterminer. Des approches par épistasie avec ExoSGAP ou les différentes formes de *Rac2* pourraient aussi permettre de mieux comprendre la position de ces gènes dans les voies de la réponse immunitaire. Par exemple, la construction de lignées recombinantes avec soit les lignées *Rac2^d* ou UAS-*Rac2* et des lignées mutantes pour des éléments de la voie des JNK tel que *hemipterous* (JNKK), *basket* (JNK) ou *traf1* pourrait nous permettre de mettre en évidence des relations entre la GTPase et les voies dépendantes des Jun kinases au cours de la réponse immunitaire.

➤ **Nouveaux éléments de contrôle de la réponse immunitaire innée et du stress oxydant.**

En collaboration avec l'équipe du Dr H. Tricoire, nous avons recherché parmi des gènes montrés comme impliqués dans la résistance au stress oxydant, de nouveaux gènes de la réponse immunitaire. J'ai testé en infection par *P. aeruginosa* (PAO1) 105 des 180 lignées UY que l'équipe du Dr H. Tricoire avait isolées comme étant sensibles ou résistantes au stress oxydant au cours d'une mutagenèse de dérégulation (Monnier et al., 2002a; Monnier et al., 2002b). Je n'ai pas mis en évidence une réelle corrélation entre la réponse aux deux stress : certaines lignées se comportent de façon similaire, d'autres présentent une corrélation inverse. De plus, la majorité des lignées ne présente pas d'effets reproductibles de résistance au stress infectieux du fait des faibles écarts obtenus en infection par piqûre septique par *P. aeruginosa*. Néanmoins, nous avons isolé quelques lignées candidates qui sont en cours de caractérisation.

L'une des lignées intéressantes est la lignée UY3121 permettant la dérégulation de la GMPc kinase. L'intérêt de cette lignée est double : elle a été sélectionnée comme légèrement résistante au stress infectieux, bien que cet effet reste à confirmer ; par ailleurs la dérégulation

de la GMPc kinase supprime le phénotype d'ExoSGAP. La GMPc kinase pourrait donc intervenir, comme chez les mammifères (Hou et al., 2004), dans la régulation des GTPases Rac dont Rac2. Elle pourrait aussi être activé par le signal NO dans la signalisation en direction du corps gras (Foley et O'Farrell, 2003; Nappi et al., 2000). En effet, le NO dans la cellule active la production de GMPc qui peut activer la GMPc kinase.

Une autre lignée présentant une légère résistance, en cours de caractérisation au laboratoire, est la lignée UY1631 permettant la dérégulation d'une protéine à domaine lectine de type lectine C, que nous avons nommé PSLR (*Pseudomonas* Sensitive Lectine Receptor). Peu de choses sont connues sur l'implication des lectines dans la réponse immunitaire chez la drosophile. Les lectines C, *lectine-28C* et *lectine-24Db*, sont exprimées dans les hémocytes et leur expression est diminuée après infection (Irving et al., 2005). Chez les mammifères, certaines protéines à domaine lectine-C, comme le récepteur au mannose, sont impliquées chez les mammifères dans la phagocytose (McCreal et al., 2005; Stuart et Ezekowitz, 2005). PSLR pourrait avoir un rôle dans la réponse immunitaire cellulaire notamment dans la phagocytose et pourrait participer à la reconnaissance des pathogènes. L'implication possible de PSLR dans la fonction des hémocytes est envisageable, la surexpression de Ras dans les hémocytes provoque la surprolifération des hémocytes et l'activation de l'expression de nombreux gènes dont PSLR (Asha et al., 2003). Des lignées transgéniques permettant la surexpression de ce gène et des lignées mutantes créées à partir de l'excision de l'élément P[UY] permettraient de mieux appréhender l'implication de PSLR dans la réponse immunitaire chez la drosophile.

➤ Conclusion générale

Les infections nosocomiales associées à *P. aeruginosa* sont fréquemment observées chez des patients présentant une immunodéficiência comme les personnes souffrant de SIDA ou de cancer, ainsi que chez les grands brûlés. Ces infections peuvent conduire à une mort très rapide de la personne concernée en moins de 24 heures. Dans le cas des personnes atteintes de la mucoviscidose, la grande majorité des patients meurent d'une infection chronique par *P. aeruginosa*.

J'ai montré *in vivo* l'effet du domaine GAP d'ExoS sur la réponse immunitaire cellulaire; cette réponse montre des similarités fonctionnelles avec celles assurées par les leucocytes chez les mammifères (Ramet et al., 2002b; Pearson et al., 2003; Tirouvanziam et al., 2004). J'ai aussi mis en évidence de nouvelles cibles potentielles de la toxine ExoS dans

l'aile ou dans l'œil qui ont ou pourraient avoir un rôle dans l'immunité (Fig. ccl.1). Il est maintenant nécessaire de vérifier ces interactions dans le cadre de la réponse immunitaire et de tester leur implication dans la réponse aux infections par *P. aeruginosa* ou d'autres pathogènes. Ceci pourrait permettre de mieux comprendre comment la bactérie affecte la réponse immunitaire chez les mammifères, par homologie avec la drosophile.

D'après les résultats et les données de la littérature, un modèle hypothétique de l'infection par *P. aeruginosa* peut être construit. Au cours de l'infection de la mouche, la bactérie peut se développer dans l'organisme en perturbant les mécanismes de défense de l'hôte. Plus particulièrement, le domaine GAP d'ExoS inhibe la phagocytose. ExoSGAP pourrait aussi agir sur un certain nombre de voies de signalisation de la réponse immunitaire et peut-être dans la signalisation dépendante du NO par l'intermédiaire de la GMPc kinase. La toxine pourrait aussi agir sur l'intégrité des épithélia, car ses cibles (Rho, Rac et Cdc42) participent à la formation des contacts cellule-cellule (Fig. ccl.1).

La stratégie utilisée pour l'étude de la toxine ExoS est applicable à n'importe quelle autre toxine de type III de fonction peu ou non connue, pour déterminer à la fois sa fonction dans un organisme entier et rechercher par mutagenèse, les voies de signalisation ciblées par cette toxine. Ces voies sont susceptibles d'avoir un rôle important dans la lutte contre les pathogènes.

Nous avons aussi identifié de nouveaux gènes participant à la réponse immunitaire en réponse à *P. aeruginosa* et au stress oxydant qui sont en cours de caractérisation au laboratoire. Nos résultats confirment qu'au moins quelques gènes pourraient agir aussi bien dans le cadre de la réponse au stress oxydant que dans le cadre de la réponse immunitaire comme c'est le cas de dUBP2 qui contrôle la voie NF- κ B en réponse aux infections et au stress oxydant dans les cellules en culture (Dominique Thenevon, résultats non publiés) et en réponse aux infections dans les adultes (Marie Gottar, résultats non publiés).

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus par des approches de génétique classique nous ont permis d'identifier des gènes cibles d'ExoS et/ou participant à la réponse immunitaire, qui nécessitent maintenant une caractérisation fonctionnelle de leur implication dans l'immunité de la drosophile.

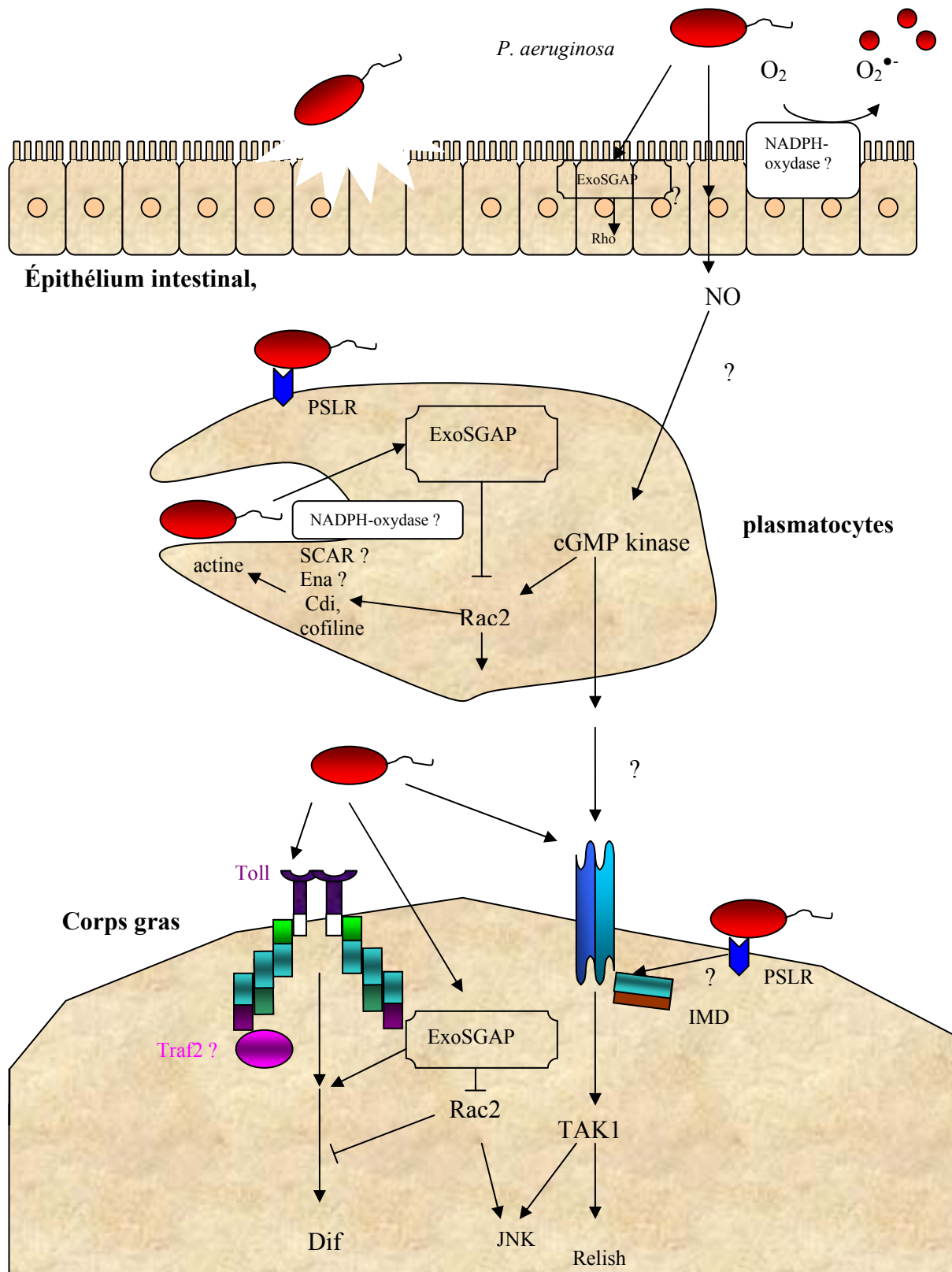


Figure ccl. 1 : Modèle hypothétique des interactions de *P. aeruginosa* avec la réponse immunitaire de la drosophile.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abo, A., Pick, E., Hall, A., Totty, N., Teahan, C. G. et Segal, A. W.** 1991. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21Rac1. *Nature* **353**: 668-70.
- Aderem, A. et Underhill, D. M.** 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* **17**: 593-623.
- Adler, V., Yin, Z., Tew, K. D. et Ronai, Z.** 1999. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* **18**: 6104-11.
- Agaisse, H. et Perrimon, N.** 2004. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol Rev* **198**: 72-82.
- Aktories, K., Schmidt, G. et Just, I.** 2000. Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol Chem* **381**: 421-6.
- Aktories, K. et Barbieri, J. T.** 2005. Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat Rev Microbiol* **3**: 397-410.
- Alfonso, T. B. et Jones, B. W.** 2002. gcm2 promotes glial cell differentiation and is required with glial cells missing for macrophage development in *Drosophila*. *Dev Biol* **248**: 369-83.
- Allen, W. E., Zicha, D., Ridley, A. J. et Jones, G. E.** 1998. A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J Cell Biol* **141**: 1147-57.
- Ambruso, D. R., Knall, C., Abell, A. N., Panepinto, J., Kurkchubasche, A., Thurman, G., Gonzalez-Aller, C., Hiester, A., Deboer, M., Harbeck, R. J., Oyer, R., Johnson, G. L. et Roos, D.** 2000. Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4654-9.
- Apidianakis, Y., Mindrinos, M. N., Xiao, W., Lau, G. W., Baldini, R. L., Davis, R. W. et Rahme, L. G.** 2005. Profiling early infection responses: *Pseudomonas aeruginosa* eludes host defenses by suppressing antimicrobial peptide gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 2573-8.
- Arbibe, L., Mira, J. P., Teusch, N., Kline, L., Guha, M., Mackman, N., Godowski, P. J., Ulevitch, R. J. et Knaus, U. G.** 2000. Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat Immunol* **1**: 533-40.
- Asehnoune, K., Strassheim, D., Mitra, S., Kim, J. Y. et Abraham, E.** 2004. Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B. *J Immunol* **172**: 2522-9.
- Asha, H., Nagy, I., Kovacs, G., Stetson, D., Ando, I. et Dearolf, C. R.** 2003. Analysis of Ras-induced overproliferation in *Drosophila* hemocytes. *Genetics* **163**: 203-15.
- Avila, A., Silverman, N., Diaz-Meco, M. T. et Moscat, J.** 2002. The *Drosophila* atypical protein kinase C-ref(2)p complex constitutes a conserved module for signaling in the toll pathway. *Mol Cell Biol* **22**: 8787-95.

B

- Ball, G., Durand, E., Lazdunski, A. et Filloux, A.** 2002. A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **43**: 475-85.
- Barbieri, A. M., Sha, Q., Bette-Bobillo, P., Stahl, P. D. et Vidal, M.** 2001. ADP-ribosylation of Rab5 by ExoS of *Pseudomonas aeruginosa* affects endocytosis. *Infect Immun* **69**: 5329-34.
- Barbieri, J. T., Riese, M. J. et Aktories, K.** 2002. Bacterial toxins that modify the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 315-44.
- Barbieri, J. T. et Sun, J.** 2004. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **152**: 79-92.

- Basset, A., Khush, R. S., Braun, A., Gardan, L., Boccard, F., Hoffmann, J. A. et Lemaitre, B.** 2000. The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3376-81.
- Battaglia, P. A., Zito, S., Macchini, A. et Gigliani, F.** 2001. A *Drosophila* model of HIV-Tat-related pathogenicity. *J Cell Sci* **114**: 2787-94.
- Bergin, D., Reeves, E. P., Renwick, J., Wientjes, F. B. et Kavanagh, K.** 2005. Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils. *Infect Immun* **73**: 4161-70.
- Berthelot, P., Attree, I., Plesiat, P., Chabert, J., De Bentzmann, S., Pozzetto, B. et Grattard, F.** 2003. Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia isolates: evidence for a possible association between O serotypes and exo genes. *J Infect Dis* **188**: 512-8.
- Bidet, Y., Jagla, T., Da Ponte, J. P., Dastugue, B. et Jagla, K.** 2003. Modifiers of muscle and heart cell fate specification identified by gain-of-function screen in *Drosophila*. *Mech Dev* **120**: 991-1007.
- Bierne, H., Gouin, E., Roux, P., Caroni, P., Yin, H. L. et Cossart, P.** 2001. A role for cofilin and LIM kinase in *Listeria*-induced phagocytosis. *J Cell Biol* **155**: 101-12.
- Bischoff, V., Vignal, C., Boneca, I. G., Michel, T., Hoffmann, J. A. et Royet, J.** 2004. Function of the drosophila pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria. *Nat Immunol* **5**: 1175-80.
- Bishop, A. L. et Hall, A.** 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348 Pt 2**: 241-55.
- Blaise, G. A., Gauvin, D., Gangal, M. et Authier, S.** 2005. Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology* **208**: 177-92.
- Blandin, S., Shiao, S. H., Moita, L. F., Janse, C. J., Waters, A. P., Kafatos, F. C. et Levashina, E. A.** 2004. Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell* **116**: 661-70.
- Bokoch, G. M.** 2005. Regulation of innate immunity by Rho GTPases. *Trends Cell Biol* **15**: 163-71.
- Boman, H. G., Nilsson, I. et Rasmuson, B.** 1972. Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*. *Nature* **237**: 232-5.
- Boutros, M., Agaisse, H. et Perrimon, N.** 2002. Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Dev Cell* **3**: 711-22.
- Braga, V. M.** 2002. Cell-cell adhesion and signalling. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 546-56.
- Brand, A. H., Manoukian, A. S. et Perrimon, N.** 1994. Ectopic expression in *Drosophila*. *Methods Cell Biol* **44**: 635-54.
- Brand, A. H. et Perrimon, N.** 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**: 401-15.
- Brandt, S. M., Dionne, M. S., Khush, R. S., Pham, L. N., Vigdal, T. J. et Schneider, D. S.** 2004. Secreted Bacterial Effectors and Host-Produced Eiger/TNF Drive Death in a *Salmonella*-Infected Fruit Fly. *PLoS Biol* **2**: e418.
- Braun, A., Hoffmann, J. A. et Meister, M.** 1998. Analysis of the *Drosophila* host defense in domino mutant larvae, which are devoid of hemocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14337-42.
- Bruno, T. F., Buser, D. E., Syme, R. M., Woods, D. E. et Mody, C. H.** 1998. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a mitogen but not a superantigen for human T lymphocytes. *Infect Immun* **66**: 3072-9.
- Bruno, T. F., Woods, D. E. et Mody, C. H.** 2000. Exoenzyme S from *Pseudomonas aeruginosa* induces apoptosis in T lymphocytes. *J Leukoc Biol* **67**: 808-16.

C

- Cammarano, M. S. et Minden, A.** 2001. Dbl and the Rho GTPases activate NF kappa B by I kappa B kinase (IKK)-dependent and IKK-independent pathways. *J Biol Chem* **276**: 25876-82.
- Caron, E. et Hall, A.** 1998. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* **282**: 1717-21.
- Cerenius, L. et Soderhall, K.** 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev* **198**: 116-26.
- Cha, G. H., Cho, K. S., Lee, J. H., Kim, M., Kim, E., Park, J., Lee, S. B. et Chung, J.** 2003. Discrete functions of TRAF1 and TRAF2 in *Drosophila melanogaster* mediated by c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB-dependent signaling pathways. *Mol Cell Biol* **23**: 7982-91.
- Chang, C. I., Pili-Floury, S., Herve, M., Parquet, C., Chelliah, Y., Lemaitre, B., Mengin-Lecreulx, D. et Deisenhofer, J.** 2004. A *Drosophila* pattern recognition receptor contains a peptidoglycan docking groove and unusual L,D-carboxypeptidase activity. *PLoS Biol* **2**: E277.
- Chang, C. I., Ihara, K., Chelliah, Y., Mengin-Lecreulx, D., Wakatsuki, S. et Deisenhofer, J.** 2005. Structure of the ectodomain of *Drosophila* peptidoglycan-recognition protein LCa suggests a molecular mechanism for pattern recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 10279-84.
- Chen, P., Rodriguez, A., Erskine, R., Thach, T. et Abrams, J. M.** 1998. Dredd, a novel effector of the apoptosis activators reaper, grim, and hid in *Drosophila*. *Dev Biol* **201**: 202-16.
- Chen, L. Y., Zuraw, B. L., Liu, F. T., Huang, S. et Pan, Z. K.** 2002. IL-1 receptor-associated kinase and low molecular weight GTPase RhoA signal molecules are required for bacterial lipopolysaccharide-induced cytokine gene transcription. *J Immunol* **169**: 3934-9.
- Chimini, G. et Chavrier, P.** 2000. Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat Cell Biol* **2**: E191-6.
- Chugani, S. A., Whiteley, M., Lee, K. M., D'argenio, D., Manoil, C. et Greenberg, E. P.** 2001. QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2752-7.
- Cicchetti, G., Allen, P. G. et Glogauer, M.** 2002. Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. *Crit Rev Oral Biol Med* **13**: 220-8.
- Clemens, J. C., Worby, C. A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Machama, T., Hemmings, B. A. et Dixon, J. E.** 2000. Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6499-503.
- Coburn, J., Dillon, S. T., Iglewski, B. H. et Gill, D. M.** 1989a. Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* ADP-ribosylates the intermediate filament protein vimentin. *Infect Immun* **57**: 996-8.
- Coburn, J., Wyatt, R. T., Iglewski, B. H. et Gill, D. M.** 1989b. Several GTP-binding proteins, including p21c-H-ras, are preferred substrates of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *J Biol Chem* **264**: 9004-8.
- Coburn, J. et Gill, D. M.** 1991. ADP-ribosylation of p21ras and related proteins by *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *Infect Immun* **59**: 4259-62.
- Coburn, J., Kane, A. V., Feig, L. et Gill, D. M.** 1991. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S requires a eukaryotic protein for ADP-ribosyltransferase activity. *J Biol Chem* **266**: 6438-46.
- Coburn, J. et Frank, D. W.** 1999. Macrophages and epithelial cells respond differently to the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Infect Immun* **67**: 3151-4.
- Coleman, M. L. et Olson, M. F.** 2002. Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. *Cell Death Differ* **9**: 493-504.
- Coppolino, M. G., Krause, M., Hagendorff, P., Monner, D. A., Trimble, W., Grinstein, S., Wehland, J. et Sechi, A. S.** 2001. Evidence for a molecular complex consisting of Fyb/SLAP, SLP-76, Nck, VASP and WASP that links the actin cytoskeleton to Fcgamma receptor signalling during phagocytosis. *J Cell Sci* **114**: 4307-18.

Cosson, P., Zulianello, L., Join-Lambert, O., Faurisson, F., Gebbie, L., Benghezal, M., Van Delden, C., Curty, L. K. et Kohler, T. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *J Bacteriol* **184**: 3027-33.

Crozatier, M., Ubeda, J. M., Vincent, A. et Meister, M. 2004. Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF orthologue collier. *PLoS Biol* **2**: E196.

D

Dacheux, D., Attree, I., Schneider, C. et Toussaint, B. 1999. Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. *Infect Immun* **67**: 6164-7.

Dacheux, D., Toussaint, B., Richard, M., Brochier, G., Croize, J. et Attree, I. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun* **68**: 2916-24.

Dacheux, D., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y. et Attree, I. 2001. Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol Microbiol* **40**: 76-85.

D'argenio, D. A., Gallagher, L. A., Berg, C. A. et Manoil, C. 2001. *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Bacteriol* **183**: 1466-71.

Darling, K. E., Dewar, A. et Evans, T. J. 2004. Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by polarized respiratory epithelial cells. *Cell Microbiol* **6**: 521-33.

De Gregorio, E., Spellman, P. T., Rubin, G. M. et Lemaitre, B. 2001. Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12590-5.

De Gregorio, E., Han, S. J., Lee, W. J., Baek, M. J., Osaki, T., Kawabata, S., Lee, B. L., Iwanaga, S., Lemaitre, B. et Brey, P. T. 2002a. An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. *Dev Cell* **3**: 581-92.

De Gregorio, E., Spellman, P. T., Tzou, P., Rubin, G. M. et Lemaitre, B. 2002b. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *Embo J* **21**: 2568-2579.

Dermardirossian, C. et Bokoch, G. M. 2005. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol* **15**: 356-63.

Diebold, B. A., Fowler, B., Lu, J., Dinauer, M. C. et Bokoch, G. M. 2004. Antagonistic cross-talk between Rac and Cdc42 GTPases regulates generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem* **279**: 28136-42.

Diener, K., Wang, X. S., Chen, C., Meyer, C. F., Keesler, G., Zukowski, M., Tan, T. H. et Yao, Z. 1997. Activation of the c-Jun N-terminal kinase pathway by a novel protein kinase related to human germinal center kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 9687-92.

Dionne, M. S., Ghorri, N. et Schneider, D. S. 2003. *Drosophila melanogaster* is a genetically tractable model host for *Mycobacterium marinum*. *Infect Immun* **71**: 3540-50.

Di-Poi, N., Faure, J., Grizot, S., Molnar, G., Pick, E. et Dagher, M. C. 2001. Mechanism of NADPH oxidase activation by the Rac/Rho-GDI complex. *Biochemistry* **40**: 10014-22.

Donabedian, H. 2003. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J Infect* **46**: 207-14.

Duvic, B., Hoffmann, J. A., Meister, M. et Royet, J. 2002. Notch Signaling Controls Lineage Specification during *Drosophila* Larval Hematopoiesis. *Curr Biol* **12**: 1923-7.

E

- Edwards, D. C., Sanders, L. C., Bokoch, G. M. et Gill, G. N.** 1999. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nature Cell Biology* **1**: 253-259.
- Elrod-Erickson, M., Mishra, S. et Schneider, D.** 2000. Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Curr Biol* **10**: 781-4.
- Elsen, S., Doussiere, J., Villiers, C. L., Faure, M., Berthier, R., Papaioannou, A., Grandvaux, N., Marche, P. N. et Vignais, P. V.** 2004. Cryptic O₂-generating NADPH oxidase in dendritic cells. *J Cell Sci* **117**: 2215-26.
- Epelman, S., Bruno, T. F., Neely, G. G., Woods, D. E. et Mody, C. H.** 2000. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S induces transcriptional expression of proinflammatory cytokines and chemokines. *Infect Immun* **68**: 4811-4.
- Epelman, S., Neely, G. G., Ma, L. L., Gjomarkaj, M., Pace, E., Melis, M., Woods, D. E. et Mody, C. H.** 2002. Distinct fates of monocytes and T cells directly activated by *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *J Leukoc Biol* **71**: 458-68.
- Epelman, S., Stack, D., Bell, C., Wong, E., Neely, G. G., Krutzik, S., Miyake, K., Kubes, P., Zbytnuik, L. D., Ma, L. L., Xie, X., Woods, D. E. et Mody, C. H.** 2004. Different domains of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S activate distinct TLRs. *J Immunol* **173**: 2031-40.
- Equils, O., Madak, Z., Liu, C., Michelsen, K. S., Bulut, Y. et Lu, D.** 2004. Rac1 and Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter protein mediate Toll-like receptor 4 induction of HIV-long terminal repeat. *J Immunol* **172**: 7642-6.
- Erickson, D. L., Lines, J. L., Pesci, E. C., Venturi, V. et Storey, D. G.** 2004. *Pseudomonas aeruginosa* relA contributes to virulence in *Drosophila melanogaster*. *Infect Immun* **72**: 5638-45.

F

- Fauvarque, M. O., Bergeret, E., Chabert, J., Dacheux, D., Satre, M. et Attree, I.** 2002. Role and activation of type III secretion system genes in *Pseudomonas aeruginosa*-induced *Drosophila* killing. *Microb Pathog* **32**: 287-95.
- Fehon, R. G., Oren, T., Lajeunesse, D. R., Melby, T. E. et McCartney, B. M.** 1997. Isolation of mutations in the *Drosophila* homologues of the human Neurofibromatosis 2 and yeast Cdc42 genes using a simple and efficient reverse-genetic method. *Genetics* **146**: 245-52.
- Feltman, H., Schulert, G., Khan, S., Jain, M., Peterson, L. et Hauser, A. R.** 2001. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **147**: 2659-69.
- Ferrandon, D., Jung, A. C., Criqui, M., Lemaitre, B., Uttenweiler-Joseph, S., Michaut, L., Reichhart, J. et Hoffmann, J. A.** 1998. A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *Embo J* **17**: 1217-27.
- Filippi, M. D., Harris, C. E., Meller, J., Gu, Y., Zheng, Y. et Williams, D. A.** 2004. Localization of Rac2 via the C terminus and aspartic acid 150 specifies superoxide generation, actin polarity and chemotaxis in neutrophils. *Nat Immunol* **5**: 744-51.
- Finck-Barbancon, V., Goranson, J., Zhu, L., Sawa, T., Wiener-Kronish, J. P., Fleiszig, S. M., Wu, C., Mende-Mueller, L. et Frank, D. W.** 1997. ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol Microbiol* **25**: 547-57.
- Florentini, C., Falzano, L., Travaglione, S. et Fabbri, A.** 2003. Hijacking Rho GTPases by protein toxins and apoptosis: molecular strategies of pathogenic bacteria. *Cell Death Differ* **10**: 147-52.
- Fleiszig, S. M., Zaidi, T. S., Preston, M. J., Grout, M., Evans, D. J. et Pier, G. B.** 1996. Relationship between cytotoxicity and corneal epithelial cell invasion by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **64**: 2288-94.

- Fleiszig, S. M., Lee, E. J., Wu, C., Andika, R. C., Vallas, V., Portoles, M. et Frank, D. W.** 1998. Cytotoxic strains of *Pseudomonas aeruginosa* can damage the intact corneal surface in vitro. *Clao J* **24**: 41-7.
- Foley, E. et O'Farrell, P. H.** 2003. Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes Dev* **17**: 115-25.
- Foley, E. et O'Farrell, P. H.** 2004. Functional dissection of an innate immune response by a genome-wide RNAi screen. *PLoS Biol* **2**: E203.
- Franc, N. C., Dimarcq, J. L., Lagueux, M., Hoffmann, J. et Ezekowitz, R. A.** 1996. Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity* **4**: 431-43.
- Franc, N. C., Heitzler, P., Ezekowitz, R. A. et White, K.** 1999. Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science* **284**: 1991-4.
- Francis, M. S., Wolf-Watz, H. et Forsberg, A.** 2002. Regulation of type III secretion systems. *Current Opinion in Microbiology* **5**: 166-172.
- Frank, D. W.** 1997. The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **26**: 621-9.
- Fraylick, J. E., La Rocque, J. R., Vincent, T. S. et Olson, J. C.** 2001. Independent and coordinate effects of ADP-ribosyltransferase and GTPase-activating activities of exoenzyme S on HT-29 epithelial cell function. *Infect Immun* **69**: 5318-28.
- Fraylick, J. E., Riese, M. J., Vincent, T. S., Barbieri, J. T. et Olson, J. C.** 2002a. ADP-ribosylation and functional effects of *Pseudomonas* exoenzyme S on cellular RalA. *Biochemistry* **41**: 9680-7.
- Fraylick, J. E., Rucks, E. A., Greene, D. M., Vincent, T. S. et Olson, J. C.** 2002b. Eukaryotic cell determination of ExoS ADP-ribosyltransferase substrate specificity. *Biochem Biophys Res Commun* **291**: 91-100.
- Frithz-Lindsten, E., Du, Y., Rosqvist, R. et Forsberg, A.** 1997. Intracellular targeting of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* via type III-dependent translocation induces phagocytosis resistance, cytotoxicity and disruption of actin microfilaments. *Mol Microbiol* **25**: 1125-39.
- Fu, H., Coburn, J. et Collier, R. J.** 1993. The eukaryotic host factor that activates exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is a member of the 14-3-3 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 2320-4.
- Fukata, M. et Kaibuchi, K.** 2001. Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 887-97.

G

- Galko, M. J. et Krasnow, M. A.** 2004. Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. *PLoS Biol* **2**: E239.
- Ganesan, A. K., Frank, D. W., Misra, R. P., Schmidt, G. et Barbieri, J. T.** 1998. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S ADP-ribosylates Ras at multiple sites. *J Biol Chem* **273**: 7332-7.
- Ganesan, A. K., Mende-Mueller, L., Selzer, J. et Barbieri, J. T.** 1999. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S, a double ADP-ribosyltransferase, resembles vertebrate mono-ADP-ribosyltransferases. *J Biol Chem* **274**: 9503-8.
- Geiser, T. K., Kazmierczak, B. I., Garrity-Ryan, L. K., Matthay, M. A. et Engel, J. N.** 2001. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT inhibits in vitro lung epithelial wound repair. *Cell Microbiol* **3**: 223-36.
- Geiszt, M. et Leto, T. L.** 2004. The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. *J Biol Chem* **279**: 51715-8.
- Georgel, P., Naitza, S., Kappler, C., Ferrandon, D., Zachary, D., Swimmer, C., Kopczynski, C., Duyk, G., Reichhart, J. M. et Hoffmann, J. A.** 2001. *Drosophila* immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. *Dev Cell* **1**: 503-14.
- Gideon, P., John, J., Frech, M., Lautwein, A., Clark, R., Scheffler, J. E. et Wittinghofer, A.** 1992. Mutational and kinetic analyses of the GTPase-activating protein (GAP)-p21 interaction: the C-terminal domain of GAP is not sufficient for full activity. *Mol Cell Biol* **12**: 2050-6.

- Girardot, F., Monnier, V. et Tricoire, H.** 2004. Genome wide analysis of common and specific stress responses in adult *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics* **5**: 74.
- Glogauer, M., Marchal, C. C., Zhu, F., Worku, A., Clausen, B. E., Foerster, I., Marks, P., Downey, G. P., Dinauer, M. et Kwiatkowski, D. J.** 2003. Rac1 deletion in mouse neutrophils has selective effects on neutrophil functions. *J Immunol* **170**: 5652-7.
- Gobert, V., Gottar, M., Matskevich, A. A., Rutschmann, S., Royet, J., Belvin, M., Hoffmann, J. A. et Ferrandon, D.** 2003. Dual activation of the *Drosophila* toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science* **302**: 2126-30.
- Goehring, U. M., Schmidt, G., Pederson, K. J., Aktories, K. et Barbieri, J. T.** 1999. The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *J Biol Chem* **274**: 36369-72.
- Gottar, M., Gobert, V., Michel, T., Belvin, M., Duyk, G., Hoffmann, J. A., Ferrandon, D. et Royet, J.** 2002. The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature* **416**: 640-4.
- Goure, J., Pastor, A., Faudry, E., Chabert, J., Dessen, A. et Attree, I.** 2004. The V antigen of *Pseudomonas aeruginosa* is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. *Infect Immun* **72**: 4741-50.
- Govan, J. R. et Deretic, V.** 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* **60**: 539-74.
- Gu, Y. et Williams, D. A.** 2002. Rac2 GTPase deficiency and myeloid cell dysfunction in human and mouse. *J Pediatr Hematol Oncol* **24**: 791-4.
- Gu, Y., Filippi, M. D., Cancelas, J. A., Siefring, J. E., Williams, E. P., Jasti, A. C., Harris, C. E., Lee, A. W., Prabhakar, R., Atkinson, S. J., Kwiatkowski, D. J. et Williams, D. A.** 2003. Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science* **302**: 445-9.

H

- Ha, E. M., Oh, C. T., Ryu, J. H., Bae, Y. S., Kang, S. W., Jang, I. H., Brey, P. T. et Lee, W. J.** 2005. An antioxidant system required for host protection against gut infection in *Drosophila*. *Dev Cell* **8**: 125-32.
- Hakeda-Suzuki, S., Ng, J., Tzu, J., Dietzl, G., Sun, Y., Harms, M., Nardine, T., Luo, L. et Dickson, B. J.** 2002. Rac function and regulation during *Drosophila* development. *Nature* **416**: 438-42.
- Hall, A.** 1990. The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* **249**: 635-40.
- Hall, A.** 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**: 509-14.
- Hall, A. et Nobes, C. D.** 2000. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**: 965-70.
- Han, Z. S., Enslen, H., Hu, X., Meng, X., Wu, I. H., Barrett, T., Davis, R. J. et Ip, Y. T.** 1998. A conserved p38 mitogen-activated protein kinase pathway regulates *Drosophila* immunity gene expression. *Mol Cell Biol* **18**: 3527-39.
- Hasegawa, M., Imamura, R., Kinoshita, T., Matsumoto, N., Masumoto, J., Inohara, N. et Suda, T.** 2005. ASC-mediated NF-kappaB activation leading to interleukin-8 production requires caspase-8 and is inhibited by CLARP. *J Biol Chem* **280**: 15122-30.
- Hauser, A. R., Kang, P. J. et Engel, J. N.** 1998. PepA, a secreted protein of *Pseudomonas aeruginosa*, is necessary for cytotoxicity and virulence. *Mol Microbiol* **27**: 807-18.
- Hauser, A. R. et Engel, J. N.** 1999. *Pseudomonas aeruginosa* induces type-III-secretion-mediated apoptosis of macrophages and epithelial cells. *Infect Immun* **67**: 5530-7.
- Hay, B. A., Huh, J. R. et Guo, M.** 2004. The genetics of cell death: approaches, insights and opportunities in *Drosophila*. *Nat Rev Genet* **5**: 911-22.
- Heck, L. W., Alarcon, P. G., Kulhavy, R. M., Morihara, K., Russell, M. W. et Mestecky, J. F.** 1990. Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J Immunol* **144**: 2253-7.

- Hedengren-Olcott, M., Olcott, M. C., Mooney, D. T., Ekengren, S., Geller, B. L. et Taylor, B. J.** 2004. Differential activation of the NF-kappaB-like factors Relish and Dif in *Drosophila melanogaster* by fungi and Gram-positive bacteria. *J Biol Chem* **279**: 21121-7.
- Hendrickson, E. L., Plotnikova, J., Mahajan-Miklos, S., Rahme, L. G. et Ausubel, F. M.** 2001. Differential roles of the *Pseudomonas aeruginosa* PA14 rpoN gene in pathogenicity in plants, nematodes, insects, and mice. *J Bacteriol* **183**: 7126-34.
- Henriksson, M. L., Rosqvist, R., Telepnev, M., Wolf-Watz, H. et Hallberg, B.** 2000a. Ras effector pathway activation by epidermal growth factor is inhibited in vivo by exoenzyme S ADP-ribosylation of Ras. *Biochem J* **347 Pt 1**: 217-22.
- Henriksson, M. L., Troller, U. et Hallberg, B.** 2000b. 14-3-3 proteins are required for the inhibition of Ras by exoenzyme S. *Biochem J* **349 Pt 3**: 697-701.
- Henriksson, M. L., Sundin, C., Jansson, A. L., Forsberg, A., Palmer, R. H. et Hallberg, B.** 2002. Exoenzyme S shows selective ADP-ribosylation and GTPase-activating protein (GAP) activities towards small GTPases in vivo. *Biochem J* **367**: 617-28.
- Hoffmann, C. et Schmidt, G.** 2004. CNF and DNT. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **152**: 49-63.
- Hoffmann, J. A. et Reichhart, J. M.** 2002. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol* **3**: 121-6.
- Hofman, P., Le Negrate, G., Mograbi, B., Hofman, V., Brest, P., Alliana-Schmid, A., Flatau, G., Boquet, P. et Rossi, B.** 2000. Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor-1 (CNF-1) increases the adherence to epithelia and the oxidative burst of human polymorphonuclear leukocytes but decreases bacteria phagocytosis. *J Leukoc Biol* **68**: 522-8.
- Holz, A., Bossinger, B., Strasser, T., Janning, W. et Klapper, R.** 2003. The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development* **130**: 4955-62.
- Hornef, M. W., Roggenkamp, A., Geiger, A. M., Hogardt, M., Jacobi, C. A. et Heesemann, J.** 2000. Triggering the ExoS regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: A GFP-reporter analysis of exoenzyme (Exo) S, ExoT and ExoU synthesis. *Microb Pathog* **29**: 329-43.
- Hornig, T. et Medzhitov, R.** 2001. *Drosophila* MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12654-8.
- Hou, Y., Ye, R. D. et Browning, D. D.** 2004. Activation of the small GTPase Rac1 by cGMP-dependent protein kinase. *Cell Signal* **16**: 1061-9.
- Hu, X., Yagi, Y., Tanji, T., Zhou, S. et Ip, Y. T.** 2004. Multimerization and interaction of Toll and Spatzle in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9369-74.
- Huang, L., Ohsako, S. et Tanda, S.** 2005. The lesswright mutation activates Rel-related proteins, leading to overproduction of larval hemocytes in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **280**: 407-20.
- Hueck, C. J.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433.

I

- Irving, P., Troxler, L., Heuer, T. S., Belvin, M., Kopczynski, C., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A. et Hetru, C.** 2001. A genome-wide analysis of immune responses in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 15119-24.
- Irving, P., Ubeda, J. M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., Hoffmann, J. A., Hetru, C. et Meister, M.** 2005. New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell Microbiol* **7**: 335-50.

J

- Jack, D. L., Lee, M. E., Turner, M. W., Klein, N. J. et Read, R. C.** 2005. Mannose-binding lectin enhances phagocytosis and killing of *Neisseria meningitidis* by human macrophages. *J Leukoc Biol* **77**: 328-36.
- Jain, M., Ramirez, D., Seshadri, R., Cullina, J. F., Powers, C. A., Schulert, G. S., Bar-Meir, M., Sullivan, C. L., McColley, S. A. et Hauser, A. R.** 2004. Type III secretion phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains change during infection of individuals with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **42**: 5229-37.
- Jander, G., Rahme, L. G. et Ausubel, F. M.** 2000. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol* **182**: 3843-5.
- Janeway, C. A., Jr.** 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54 Pt 1**: 1-13.
- Jenkins, C. E., Swiatoniowski, A., Issekutz, A. C. et Lin, T. J.** 2004. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A induces human mast cell apoptosis by a caspase-8 and -3-dependent mechanism. *J Biol Chem* **279**: 37201-7.
- Jia, J., Alaoui-El-Azher, M., Chow, M., Chambers, T. C., Baker, H. et Jin, S.** 2003. c-Jun NH2-terminal kinase-mediated signaling is essential for *Pseudomonas aeruginosa* ExoS-induced apoptosis. *Infect Immun* **71**: 3361-70.
- Johansson, K. C., Metzendorf, C. et Soderhall, K.** 2005. Microarray analysis of immune challenged *Drosophila* hemocytes. *Exp Cell Res* **305**: 145-55.
- Jullien-Flores, V., Dorseuil, O., Romero, F., Letourneur, F., Saragosti, S., Berger, R., Tavitian, A., Gacon, G. et Camonis, J. H.** 1995. Bridging Ral GTPase to Rho pathways. RLIP76, a Ral effector with Cdc42/Rac GTPase-activating protein activity. *J Biol Chem* **270**: 22473-7.

K

- Kallio, J., Leinonen, A., Ulvila, J., Valanne, S., Ezekowitz, R. A. et Ramet, M.** 2005. Functional analysis of immune response genes in *Drosophila* identifies JNK pathway as a regulator of antimicrobial peptide gene expression in S2 cells. *Microbes Infect* **7**: 811-9.
- Kaneko, T. et Silverman, N.** 2005. Bacterial recognition and signalling by the *Drosophila* IMD pathway. *Cell Microbiol* **7**: 1049-50.
- Kaufman, M. R., Jia, J., Zeng, L., Ha, U., Chow, M. et Jin, S.** 2000. *Pseudomonas aeruginosa* mediated apoptosis requires the ADP-ribosylating activity of exoS. *Microbiology* **146 (Pt 10)**: 2531-41.
- Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Muhlradt, P. F., Sato, S., Hoshino, K. et Akira, S.** 2001. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* **167**: 5887-94.
- Kazmierczak, B. I. et Engel, J. N.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT acts in vivo as a GTPase-activating protein for RhoA, Rac1, and Cdc42. *Infect Immun* **70**: 2198-205.
- Kazmierczak, B. I., Mostov, K. et Engel, J. N.** 2004. Epithelial cell polarity alters Rho-GTPase responses to *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Biol Cell* **15**: 411-9.
- Kelso, R. J., Buszczak, M., Quinones, A. T., Castiblanco, C., Mazzalupo, S. et Cooley, L.** 2004. Flytrap, a database documenting a GFP protein-trap insertion screen in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* **32**: D418-20.
- Khush, R. S., Cornwell, W. D., Uram, J. N. et Lemaitre, B.** 2002. A ubiquitin-proteasome pathway represses the *Drosophila* immune deficiency signaling cascade. *Curr Biol* **12**: 1728-37.
- Kim, C., Marchal, C. C., Penninger, J. et Dinauer, M. C.** 2003a. The hemopoietic Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor Vav1 regulates N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-activated neutrophil functions. *J Immunol* **171**: 4425-30.
- Kim, M. S., Byun, M. et Oh, B. H.** 2003b. Crystal structure of peptidoglycan recognition protein LB from *Drosophila melanogaster*. *Nat Immunol* **4**: 787-93.

- Kim, T., Yoon, J., Cho, H., Lee, W. B., Kim, J., Song, Y. H., Kim, S. N., Yoon, J. H., Kim-Ha, J. et Kim, Y. J.** 2005. Downregulation of lipopolysaccharide response in *Drosophila* by negative crosstalk between the AP1 and NF-kappaB signaling modules. *Nat Immunol* **6**: 211-8.
- Kim, Y. S., Ryu, J. H., Han, S. J., Choi, K. H., Nam, K. B., Jang, I. H., Lemaitre, B., Brey, P. T. et Lee, W. J.** 2000. Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster* cells. *J Biol Chem* **275**: 32721-7.
- Knaus, U. G., Wang, Y., Reilly, A. M., Warnock, D. et Jackson, J. H.** 1998. Structural requirements for PAK activation by Rac GTPases. *J Biol Chem* **273**: 21512-8.
- Knight, D. A., Finck-Barbancon, V., Kulich, S. M. et Barbieri, J. T.** 1995. Functional domains of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *Infect Immun* **63**: 3182-6.
- Knight, D. A. et Barbieri, J. T.** 1997. Ecto-ADP-ribosyltransferase activity of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *Infect Immun* **65**: 3304-9.
- Kohler, T., Curty, L. K., Barja, F., Van Delden, C. et Pechere, J. C.** 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* **182**: 5990-6.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A. et Lim, L.** 1996. The GTPase-activating protein n-chimaerin cooperates with Rac1 and Cdc42Hs to induce the formation of lamellipodia and filopodia. *Mol Cell Biol* **16**: 5069-80.
- Kozma, R., Sarnier, S., Ahmed, S. et Lim, L.** 1997. Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol Cell Biol* **17**: 1201-11.
- Krall, R., Sun, J., Pederson, K. J. et Barbieri, J. T.** 2002. In vivo Rho GTPase-activating protein activity of *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoS. *Infect Immun* **70**: 360-7.
- Krause, M., Dent, E. W., Bear, J. E., Loureiro, J. J. et Gertler, F. B.** 2003. Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 541-64.
- Kulich, S. M., Frank, D. W. et Barbieri, J. T.** 1995. Expression of recombinant exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **63**: 1-8.
- Kumar, S., Christophides, G. K., Cantera, R., Charles, B., Han, Y. S., Meister, S., Dimopoulos, G., Kafatos, F. C. et Barillas-Mury, C.** 2003. The role of reactive oxygen species on *Plasmodium* melanotic encapsulation in *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 14139-44.
- Kumar, S., Gupta, L., Han, Y. S. et Barillas-Mury, C.** 2004. Inducible peroxidases mediate nitration of anopheles midgut cells undergoing apoptosis in response to *Plasmodium* invasion. *J Biol Chem* **279**: 53475-82.
- Kuranaga, E., Kanuka, H., Igaki, T., Sawamoto, K., Ichijo, H., Okano, H. et Miura, M.** 2002. Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* **4**: 705-10.

L

- Labrosse, C., Eslin, P., Doury, G., Drezen, J. M. et Poirie, M.** 2005a. Haemocyte changes in *D. Melanogaster* in response to long gland components of the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi*: a Rho-GAP protein as an important factor. *J Insect Physiol* **51**: 161-70.
- Labrosse, C., Stasiak, K., Lesobre, J., Grangeia, A., Huguet, E., Drezen, J. M. et Poirie, M.** 2005b. A RhoGAP protein as a main immune suppressive factor in the *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera, Figitidae)-*Drosophila melanogaster* interaction. *Insect Biochem Mol Biol* **35**: 93-103.
- Lagueux, M., Perrodou, E., Levashina, E. A., Capovilla, M. et Hoffmann, J. A.** 2000. Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11427-32.
- Lamarche, N. et Hall, A.** 1994. GAPs for rho-related GTPases. *Trends Genet* **10**: 436-40.
- Lambeth, J. D.** 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* **4**: 181-9.

- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F. et Meister, M.** 2001. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev Biol* **230**: 243-57.
- Lau, G. W., Goumnerov, B. C., Walendziewicz, C. L., Hewitson, J., Xiao, W., Mahajan-Miklos, S., Tompkins, R. G., Perkins, L. A. et Rahme, L. G.** 2003. The *Drosophila melanogaster* toll pathway participates in resistance to infection by the Gram-negative human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **71**: 4059-66.
- Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H. et Kong, F.** 2004. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med* **10**: 599-606.
- Lau, G. W., Britigan, B. E. et Hassett, D. J.** 2005. *Pseudomonas aeruginosa* OxyR is required for full virulence in rodent and insect models of infection and for resistance to human neutrophils. *Infect Immun* **73**: 2550-3.
- Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V. et Banerjee, U.** 2000. Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science* **288**: 146-9.
- Lee, J. S., Heo, Y. J., Lee, J. K. et Cho, Y. H.** 2005a. KatA, the major catalase, is critical for osmoprotection and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Infect Immun* **73**: 4399-403.
- Lee, S. B., Park, J., Jung, J. U. et Chung, J.** 2005b. Nef induces apoptosis by activating JNK signaling pathway and inhibits NF-kappaB-dependent immune responses in *Drosophila*. *J Cell Sci* **118**: 1851-9.
- Lee, V. T., Smith, R. S., Tummler, B. et Lory, S.** 2005c. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection. *Infect Immun* **73**: 1695-705.
- Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J. M. et Hoffmann, J. A.** 1995. A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9465-9.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. et Hoffmann, J. A.** 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**: 973-83.
- Lemaitre, B., Reichhart, J. M. et Hoffmann, J. A.** 1997. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 14614-9.
- Leulier, F., Rodriguez, A., Khush, R. S., Abrams, J. M. et Lemaitre, B.** 2000. The *Drosophila* caspase Dredd is required to resist Gram-negative bacterial infection. *EMBO Rep* **1**: 353-8.
- Leulier, F., Vidal, S., Saigo, K., Ueda, R. et Lemaitre, B.** 2002. Inducible expression of double-stranded RNA reveals a role for dFADD in the regulation of the antibacterial response in *Drosophila* adults. *Curr Biol* **12**: 996-1000.
- Leulier, F., Marchal, C., Miletich, I., Limbourg-Bouchon, B., Benarous, R. et Lemaitre, B.** 2003. Directed expression of the HIV-1 accessory protein Vpu in *Drosophila* fat-body cells inhibits Toll-dependent immune responses. *EMBO Rep* **4**: 976-81.
- Levashina, E. A., Moita, L. F., Blandin, S., Vriend, G., Lagueux, M. et Kafatos, F. C.** 2001. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell* **104**: 709-18.
- Levy, F., Bulet, P. et Ehret-Sabatier, L.** 2004. Proteomic analysis of the systemic immune response of *Drosophila*. *Mol Cell Proteomics* **3**: 156-66.
- Li, S., Yamauchi, A., Marchal, C. C., Molitoris, J. K., Quilliam, L. A. et Dinanuer, M. C.** 2002. Chemoattractant-stimulated Rac activation in wild-type and Rac2-deficient murine neutrophils: preferential activation of Rac2 and Rac2 gene dosage effect on neutrophil functions. *J Immunol* **169**: 5043-51.
- Ligoxygakis, P., Pelte, N., Ji, C., Leclerc, V., Duvic, B., Belvin, M., Jiang, H., Hoffmann, J. A. et Reichhart, J. M.** 2002. A serpin mutant links Toll activation to melanization in the host defence of *Drosophila*. *Embo J* **21**: 6330-7.
- Liu, H., Su, Y. C., Becker, E., Treisman, J. et Skolnik, E. Y.** 1999. A *Drosophila* TNF-receptor-associated factor (TRAF) binds the ste20 kinase Misshapen and activates Jun kinase. *Curr Biol* **9**: 101-4.

Lomholt, J. A., Poulsen, K. et Kilian, M. 2001. Epidemic population structure of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a clone that is pathogenic to the eye and that has a distinct combination of virulence factors. *Infect Immun* **69**: 6284-95.

Luo, H., Hanratty, W. P. et Dearolf, C. R. 1995. An amino acid substitution in the *Drosophila* hopTum-1 Jak kinase causes leukemia-like hematopoietic defects. *Embo J* **14**: 1412-20.

Lyczak, J. B., Cannon, C. L. et Pier, G. B. 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* **2**: 1051-60.

M

Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K. et Narumiya, S. 1999. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* **285**: 895-8.

Mahajan-Miklos, S., Rahme, L. G. et Ausubel, F. M. 2000. Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts. *Mol Microbiol* **37**: 981-8.

Manfrulli, P., Reichhart, J. M., Steward, R., Hoffmann, J. A. et Lemaitre, B. 1999. A mosaic analysis in *Drosophila* fat body cells of the control of antimicrobial peptide genes by the Rel proteins Dorsal and DIF. *Embo J* **18**: 3380-91.

Mansfield, B. E., Dionne, M. S., Schneider, D. S. et Freitag, N. E. 2003. Exploration of host-pathogen interactions using *Listeria monocytogenes* and *Drosophila melanogaster*. *Cell Microbiol* **5**: 901-11.

Maresso, A. W., Baldwin, M. R. et Barbieri, J. T. 2004. Ezrin/radixin/moesin proteins are high affinity targets for ADP-ribosylation by *Pseudomonas aeruginosa* ExoS. *J Biol Chem* **279**: 38402-8.

Massol, P., Montcourrier, P., Guillemot, J. C. et Chavrier, P. 1998. Fc receptor-mediated phagocytosis requires Cdc42 and Rac1. *Embo J* **17**: 6219-29.

Masumoto, J., Dowds, T. A., Schaner, P., Chen, F. F., Ogura, Y., Li, M., Zhu, L., Katsuyama, T., Sagara, J., Taniguchi, S., Gumucio, D. L., Nunez, G. et Inohara, N. 2003. ASC is an activating adaptor for NF-kappa B and caspase-8-dependent apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **303**: 69-73.

Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., Koyasu, S., Matsumoto, K., Takeda, K. et Ichijo, H. 2005. ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol* **6**: 587-92.

McClure, C. D. et Schiller, N. L. 1996. Inhibition of macrophage phagocytosis by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids in vitro and in vivo. *Curr Microbiol* **33**: 109-17.

McConnell, B. B. et Vertino, P. M. 2000. Activation of a caspase-9-mediated apoptotic pathway by subcellular redistribution of the novel caspase recruitment domain protein TMS1. *Cancer Res* **60**: 6243-7.

McGreal, E. P., Martinez-Pomares, L. et Gordon, S. 2004. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol Immunol* **41**: 1109-21.

McGuffie, E. M., Frank, D. W., Vincent, T. S. et Olson, J. C. 1998. Modification of Ras in eukaryotic cells by *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *Infect Immun* **66**: 2607-13.

McGuffie, E. M., Fraylick, J. E., Hazen-Martin, D. J., Vincent, T. S. et Olson, J. C. 1999. Differential sensitivity of human epithelial cells to *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *Infect Immun* **67**: 3494-503.

McMorran, B., Town, L., Costelloe, E., Palmer, J., Engel, J., Hume, D. et Wainwright, B. 2003. Effector ExoU from the type III secretion system is an important modulator of gene expression in lung epithelial cells in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Infect Immun* **71**: 6035-44.

Meister, M. 2004. Blood cells of *Drosophila*: cell lineages and role in host defence. *Curr Opin Immunol* **16**: 10-5.

Meister, M. et Lagueux, M. 2003. *Drosophila* blood cells. *Cell Microbiol* **5**: 573-80.

Mellroth, P., Karlsson, J., Hakansson, J., Schultz, N., Goldman, W. E. et Steiner, H. 2005. Ligand-induced dimerization of *Drosophila* peptidoglycan recognition proteins in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 6455-60.

- Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'eustachio, P., Rush, M. et Philips, M. R.** 2001. Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol* **152**: 111-26.
- Michel, T., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A. et Royet, J.** 2001. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* **414**: 756-9.
- Miyata, S., Casey, M., Frank, D. W., Ausubel, F. M. et Drenkard, E.** 2003. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect Immun* **71**: 2404-13.
- Mody, C. H., Buser, D. E., Syme, R. M. et Woods, D. E.** 1995. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S induces proliferation of human T lymphocytes. *Infect Immun* **63**: 1800-5.
- Monnier, V., Girardot, F., Audin, W. et Tricoire, H.** 2002a. Control of oxidative stress resistance by IP3 kinase in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic Biol Med* **33**: 1250-9.
- Monnier, V., Girardot, F., Cheret, C., Andres, O. et Tricoire, H.** 2002b. Modulation of oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster* by gene overexpression. *Genesis* **34**: 76-9.
- Montaner, S., Perona, R., Saniger, L. et Lacal, J. C.** 1998. Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor kappaB by the Rho family of GTPases. *J Biol Chem* **273**: 12779-85.
- Munier, A. I., Doucet, D., Perrodou, E., Zachary, D., Meister, M., Hoffmann, J. A., Janeway, C. A., Jr. et Lagueux, M.** 2002. PVF2, a PDGF/VEGF-like growth factor, induces hemocyte proliferation in *Drosophila* larvae. *EMBO Rep* **3**: 1195-200.
- Myokai, F., Takashiba, S., Lebo, R. et Amar, S.** 1999. A novel lipopolysaccharide-induced transcription factor regulating tumor necrosis factor alpha gene expression: molecular cloning, sequencing, characterization, and chromosomal assignment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4518-23.

N

- Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F. et Carton, Y.** 1995. Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *Eur J Cell Biol* **68**: 450-6.
- Nappi, A. J. et Vass, E.** 1998. Hydrogen peroxide production in immune-reactive *Drosophila melanogaster*. *J Parasitol* **84**: 1150-7.
- Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F. et Carton, Y.** 2000. Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide* **4**: 423-30.
- Needham, A. J., Kibart, M., Crossley, H., Ingham, P. W. et Foster, S. J.** 2004. *Drosophila melanogaster* as a model host for *Staphylococcus aureus* infection. *Microbiology* **150**: 2347-55.
- Nelson, R. E., Fessler, L. I., Takagi, Y., Blumberg, B., Keene, D. R., Olson, P. F., Parker, C. G. et Fessler, J. H.** 1994. Peroxidase: a novel enzyme-matrix protein of *Drosophila* development. *Embo J* **13**: 3438-47.
- Ng, J., Nardine, T., Harms, M., Tzu, J., Goldstein, A., Sun, Y., Dietzl, G., Dickson, B. J. et Luo, L.** 2002. Rac GTPases control axon growth, guidance and branching. *Nature* **416**: 442-7.
- Nicolai, M., Lasbleiz, C. et Dura, J. M.** 2003. Gain-of-function screen identifies a role of the Src64 oncogene in *Drosophila* mushroom body development. *J Neurobiol* **57**: 291-302.
- Nobes, C. D. et Hall, A.** 1999. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* **144**: 1235-44.
- Nobes, C. D. et Hall, A.** 1995. Rho, Rac and Cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans* **23**: 456-9.
- Noselli, S.** 2002. *Drosophila*, actin and videotape -- new insights in wound healing. *Nat Cell Biol* **4**: E251-3.
- Noselli, S. et Agnes, F.** 1999. Roles of the JNK signaling pathway in *Drosophila* morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **9**: 466-72.

O

- Ohashi, K., Hosoya, T., Takahashi, K., Hing, H. et Mizuno, K.** 2000. A *Drosophila* homolog of LIM-kinase phosphorylates cofilin and induces actin cytoskeletal reorganization. *Biochem Biophys Res Commun* **276**: 1178-85.
- Olazabal, I. M., Caron, E., May, R. C., Schilling, K., Knecht, D. A. et Machesky, L. M.** 2002. Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not FcgammaR, phagocytosis. *Curr Biol* **12**: 1413-18.
- Olson, J. C., McGuffie, E. M. et Frank, D. W.** 1997. Effects of differential expression of the 49-kilodalton exoenzyme S by *Pseudomonas aeruginosa* on cultured eukaryotic cells. *Infect Immun* **65**: 248-56.

P

- Paladi, M. et Tepass, U.** 2004. Function of Rho GTPases in embryonic blood cell migration in *Drosophila*. *J Cell Sci* **117**: 6313-26.
- Park, H. S., Jung, H. Y., Park, E. Y., Kim, J., Lee, W. J. et Bae, Y. S.** 2004a. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J Immunol* **173**: 3589-93.
- Park, J. M., Brady, H., Ruocco, M. G., Sun, H., Williams, D., Lee, S. J., Kato, T., Jr., Richards, N., Chan, K., Mercurio, F., Karin, M. et Wasserman, S. A.** 2004b. Targeting of TAK1 by the NF-kappa B protein Relish regulates the JNK-mediated immune response in *Drosophila*. *Genes Dev* **18**: 584-94.
- Patel, J. C., Hall, A. et Caron, E.** 2002. Vav regulates activation of Rac but not Cdc42 during FcgammaR-mediated phagocytosis. *Mol Biol Cell* **13**: 1215-26.
- Pearson, A. M., Baksa, K., Ramet, M., Protas, M., McKee, M., Brown, D. et Ezekowitz, R. A.** 2003. Identification of cytoskeletal regulatory proteins required for efficient phagocytosis in *Drosophila*. *Microbes Infect* **5**: 815-24.
- Pederson, K. J. et Barbieri, J. T.** 1998. Intracellular expression of the ADP-ribosyltransferase domain of *Pseudomonas* exoenzyme S is cytotoxic to eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **30**: 751-9.
- Pederson, K. J., Krall, R., Riese, M. J. et Barbieri, J. T.** 2002. Intracellular localization modulates targeting of ExoS, a type III cytotoxin, to eukaryotic signalling proteins. *Mol Microbiol* **46**: 1381-90.
- Pederson, K. J., Pal, S., Vallis, A. J., Frank, D. W. et Barbieri, J. T.** 2000. Intracellular localization and processing of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS in eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **37**: 287-99.
- Pederson, K. J., Vallis, A. J., Aktories, K., Frank, D. W. et Barbieri, J. T.** 1999. The amino-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS disrupts actin filaments via small-molecular-weight GTP-binding proteins. *Mol Microbiol* **32**: 393-401.
- Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sanchez-Perez, I., Bravo, R. et Lacal, J. C.** 1997. Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, Cdc42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev* **11**: 463-75.
- Philips, J. A., Rubin, E. J. et Perrimon, N.** 2005. *Drosophila* RNAi Screen Reveals CD36 Family Member Required for Mycobacterial Infection. *Science* **309**:1251-3.
- Phillips, R. M., Six, D. A., Dennis, E. A. et Ghosh, P.** 2003. In vivo phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with phospholipase A2 inhibitors. *J Biol Chem* **278**: 41326-32.
- Pier, G. B., Grout, M., Zaidi, T. S. et Goldberg, J. B.** 1996a. How mutant CFTR may contribute to *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **154**: S175-82.
- Pier, G. B., Grout, M., Zaidi, T. S., Olsen, J. C., Johnson, L. G., Yankaskas, J. R. et Goldberg, J. B.** 1996b. Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science* **271**: 64-7.
- Pili-Floury, S., Leulier, F., Takahashi, K., Saigo, K., Samain, E., Ueda, R. et Lemaitre, B.** 2004. In vivo RNA interference analysis reveals an unexpected role for GNBPI in the defense against Gram-positive bacterial infection in *Drosophila* adults. *J Biol Chem* **279**: 12848-53.

Potvin, E., Lehoux, D. E., Kukavica-Ibrulj, I., Richard, K. L., Sanschagrin, F., Lau, G. W. et Levesque, R. C. 2003. In vivo functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. *Environ Microbiol* **5**: 1294-308.

Q

Qiu, P., Pan, P. C. et Govind, S. 1998. A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. *Development* **125**: 1909-20.

R

Radke, J., Pederson, K. J. et Barbieri, J. T. 1999. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a biglutamic acid ADP-ribosyltransferase. *Infect Immun* **67**: 1508-10.

Raftopoulou, M. et Hall, A. 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* **265**: 23-32.

Rahme, L. G., Ausubel, F. M., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B. C., Lau, G. W., Mahajan-Miklos, S., Plotnikova, J., Tan, M. W., Tsongalis, J., Walendziewicz, C. L. et Tompkins, R. G. 2000. Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8815-21.

Ramamurthi, K. S. et Schneewind, O. 2003. Substrate recognition by the *Yersinia* type III protein secretion machinery. *Mol Microbiol* **50**: 1095-102.

Ramet, M., Pearson, A., Manfrulli, P., Li, X., Koziel, H., Gobel, V., Chung, E., Krieger, M. et Ezekowitz, R. A. 2001. *Drosophila* scavenger receptor CI is a pattern recognition receptor for bacteria. *Immunity* **15**: 1027-38.

Ramet, M., Lanot, R., Zachary, D. et Manfrulli, P. 2002a. JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila*. *Dev Biol* **241**: 145-56.

Ramet, M., Manfrulli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B. et Ezekowitz, R. A. 2002b. Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature* **416**: 644-8.

Raymond, K., Bergeret, E., Avet-Rochex, A., Griffin-Shea, R. et Fauvarque, M. O. 2004. A screen for modifiers of RacGAP(84C) gain-of-function in the *Drosophila* eye revealed the LIM kinase Cdi/TESK1 as a downstream effector of Rac1 during spermatogenesis. *J Cell Sci* **117**: 2777-89.

Riese, M. J. et Barbieri, J. T. 2002. Membrane localization contributes to the in vivo ADP-ribosylation of Ras by *Pseudomonas aeruginosa* ExoS. *Infect Immun* **70**: 2230-2.

Riese, M. J., Goehring, U. M., Ehrmantraut, M. E., Moss, J., Barbieri, J. T., Aktories, K. et Schmidt, G. 2002. Auto-ADP-ribosylation of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS. *J Biol Chem* **277**: 12082-8.

Riese, M. J., Wittinghofer, A. et Barbieri, J. T. 2001. ADP ribosylation of Arg41 of Rap by ExoS inhibits the ability of Rap to interact with its guanine nucleotide exchange factor, C3G. *Biochemistry* **40**: 3289-94.

Rizki, R. M. et Rizki, T. M. 1990. Parasitoid virus-like particles destroy *Drosophila* cellular immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 8388-92.

Roberts, A. W., Kim, C., Zhen, L., Lowe, J. B., Kapur, R., Petryniak, B., Spaetti, A., Pollock, J. D., Borneo, J. B., Bradford, G. B., Atkinson, S. J., Dinauer, M. C. et Williams, D. A. 1999. Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense. *Immunity* **10**: 183-96.

Rocha, C. L., Coburn, J., Rucks, E. A. et Olson, J. C. 2003. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S as a bifunctional enzyme in J774A.1 macrophages. *Infect Immun* **71**: 5296-305.

Rogers, S. L., Wiedemann, U., Stuurman, N. et Vale, R. D. 2003. Molecular requirements for actin-based lamella formation in *Drosophila* S2 cells. *J Cell Biol* **162**: 1079-88.

Rorth, P. 1996. A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 12418-22.

- Roy-Burman, A., Savel, R. H., Racine, S., Swanson, B. L., Revadigar, N. S., Fujimoto, J., Sawa, T., Frank, D. W. et Wiener-Kronish, J. P.** 2001. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis* **183**: 1767-74.
- Royet, J.** 2004. Infectious non-self recognition in invertebrates: lessons from *Drosophila* and other insect models. *Mol Immunol* **41**: 1063-75.
- Rubin, G. M. et Spradling, A. C.** 1983. Vectors for P element-mediated gene transfer in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res* **11**: 6341-51.
- Rucks, E. A., Fraylick, J. E., Brandt, L. M., Vincent, T. S. et Olson, J. C.** 2003. Cell line differences in bacterially translocated ExoS ADP-ribosyltransferase substrate specificity. *Microbiology* **149**: 319-31.
- Rucks, E. A. et Olson, J. C.** 2005. Characterization of an ExoS Type III translocation-resistant cell line. *Infect Immun* **73**: 638-43.
- Rutschmann, S., Jung, A. C., Hetru, C., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A. et Ferrandon, D.** 2000a. The Rel protein DIF mediates the antifungal but not the antibacterial host defense in *Drosophila*. *Immunity* **12**: 569-80.
- Rutschmann, S., Jung, A. C., Zhou, R., Silverman, N., Hoffmann, J. A. et Ferrandon, D.** 2000b. Role of *Drosophila* IKK gamma in a toll-independent antibacterial immune response. *Nat Immunol* **1**: 342-7.
- Rutschmann, S., Kilinc, A. et Ferrandon, D.** 2002. Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to Gram-positive bacterial infections in *Drosophila*. *J Immunol* **168**: 1542-6.
- Ryan, K. A., Smith, M. F., Jr., Sanders, M. K. et Ernst, P. B.** 2004. Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. *Infect Immun* **72**: 2123-30.

S

- Sarfstein, R., Gorzalczany, Y., Mizrahi, A., Berdichevsky, Y., Molshanski-Mor, S., Weinbaum, C., Hirshberg, M., Dagher, M. C. et Pick, E.** 2004. Dual role of Rac in the assembly of NADPH oxidase, tethering to the membrane and activation of p67phox: a study based on mutagenesis of p67phox-Rac1 chimeras. *J Biol Chem* **279**: 16007-16.
- Sasamura, T., Kobayashi, T., Kojima, S., Qadota, H., Ohya, Y., Masai, I. et Hotta, Y.** 1997. Molecular cloning and characterization of *Drosophila* genes encoding small GTPases of the Rab and Rho families. *Mol Gen Genet* **254**: 486-94.
- Sato, H., Frank, D. W., Hillard, C. J., Feix, J. B., Pankhaniya, R. R., Moriyama, K., Finck-Barbancon, V., Buchaklian, A., Lei, M., Long, R. M., Wiener-Kronish, J. et Sawa, T.** 2003. The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *Embo J* **22**: 2959-69.
- Sato, H. et Frank, D. W.** 2004. ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Mol Microbiol* **53**: 1279-90.
- Schneider, I.** 1972. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* **27**: 353-65.
- Schroeder, T. H., Lee, M. M., Yacono, P. W., Cannon, C. L., Gerceker, A. A., Golan, D. E. et Pier, G. B.** 2002. CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 6907-12.
- Schulert, G. S., Feltman, H., Rabin, S. D., Martin, C. G., Battle, S. E., Rello, J. et Hauser, A. R.** 2003. Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia. *J Infect Dis* **188**: 1695-706.
- Schwartz, M.** 2004. Rho signalling at a glance. *J Cell Sci* **117**: 5457-8.
- Scott, R. C., Schuldiner, O. et Neufeld, T. P.** 2004. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev Cell* **7**: 167-78.
- Shen, B., Liu, H., Skolnik, E. Y. et Manley, J. L.** 2001. Physical and functional interactions between *Drosophila* TRAF2 and Pelle kinase contribute to Dorsal activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8596-601.
- Silverman, N., Zhou, R., Stoven, S., Pandey, N., Hultmark, D. et Maniatis, T.** 2000. A *Drosophila* IkappaB kinase complex required for Relish cleavage and antibacterial immunity. *Genes Dev* **14**: 2461-71.

- Silverman, N. et Maniatis, T.** 2001. NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev* **15**: 2321-42.
- Silverman, N., Zhou, R., Erlich, R. L., Hunter, M., Bernstein, E., Schneider, D. et Maniatis, T.** 2003. Immune activation of NF-kappaB and JNK requires *Drosophila* TAK1. *J Biol Chem* **278**: 48928-34.
- Sluss, H. K., Han, Z., Barrett, T., Davis, R. J. et Ip, Y. T.** 1996. A JNK signal transduction pathway that mediates morphogenesis and an immune response in *Drosophila*. *Genes Dev* **10**: 2745-58.
- Sorrentino, R. P., Carton, Y. et Govind, S.** 2002. Cellular immune response to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated. *Dev Biol* **243**: 65-80.
- Srinivasan, S., Wang, F., Glavas, S., Ott, A., Hofmann, F., Aktories, K., Kalman, D. et Bourne, H. R.** 2003. Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol* **160**: 375-85.
- Srinivasula, S. M., Poyet, J. L., Razmara, M., Datta, P., Zhang, Z. et Alnemri, E. S.** 2002. The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *J Biol Chem* **277**: 21119-22.
- Stoven, S., Silverman, N., Junell, A., Hedengren-Olcott, M., Erturk, D., Engstrom, Y., Maniatis, T. et Hultmark, D.** 2003. Caspase-mediated processing of the *Drosophila* NF-kappaB factor Relish. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 5991-6.
- Stramer, B., Wood, W., Galko, M. J., Redd, M. J., Jacinto, A., Parkhurst, S. M. et Martin, P.** 2005. Live imaging of wound inflammation in *Drosophila* embryos reveals key roles for small GTPases during in vivo cell migration. *J Cell Biol* **168**: 567-73.
- Strutt, D. I., Weber, U. et Mlodzik, M.** 1997. The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signalling. *Nature* **387**: 292-5.
- Stuart, L. M. et Ezekowitz, R. A.** 2005. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* **22**: 539-50.
- Sun, C. X., Downey, G. P., Zhu, F., Koh, A. L., Thang, H. et Glogauer, M.** 2004. Rac1 is the small GTPase responsible for regulating the neutrophil chemotaxis compass. *Blood* **104**: 3758-65.
- Sun, H., Bristow, B. N., Qu, G. et Wasserman, S. A.** 2002. A heterotrimeric death domain complex in Toll signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 12871-6.
- Sun, J. et Barbieri, J. T.** 2003. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT ADP-ribosylates CT10 regulator of kinase (Crk) proteins. *J Biol Chem* **278**: 32794-800.
- Sun, J. et Barbieri, J. T.** 2004. ExoS Rho GTPase-activating protein activity stimulates reorganization of the actin cytoskeleton through Rho GTPase guanine nucleotide disassociation inhibitor. *J Biol Chem* **279**: 42936-44.
- Sundin, C., Henriksson, M. L., Hallberg, B., Forsberg, A. et Frithz-Lindsten, E.** 2001. Exoenzyme T of *Pseudomonas aeruginosa* elicits cytotoxicity without interfering with Ras signal transduction. *Cell Microbiol* **3**: 237-46.
- Sundin, C., Hallberg, B. et Forsberg, A.** 2004. ADP-ribosylation by exoenzyme T of *Pseudomonas aeruginosa* induces an irreversible effect on the host cell cytoskeleton in vivo. *FEMS Microbiol Lett* **234**: 87-91.
- Symons, M. et Settleman, J.** 2000. Rho family GTPases: more than simple switches. *Trends Cell Biol* **10**: 415-9.

T

- Takai, Y., Sasaki, T. et Matozaki, T.** 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**: 153-208.
- Takehana, A., Katsuyama, T., Yano, T., Oshima, Y., Takada, H., Aigaki, T. et Kurata, S.** 2002. Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13705-10.
- Takehana, A., Yano, T., Mita, S., Kotani, A., Oshima, Y. et Kurata, S.** 2004. Peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LE and PGRP-LC act synergistically in *Drosophila* immunity. *Embo J* **23**: 4690-700.

- Tampakaki, A. P., Fadouloulou, V. E., Gazi, A. D., Panopoulos, N. J. et Kokkinidis, M.** 2004. Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol* **6**: 805-16.
- Tamura, M., Ajayi, T., Allmond, L. R., Moriyama, K., Wiener-Kronish, J. P. et Sawa, T.** 2004. Lysophospholipase A activity of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretory toxin ExoU. *Biochem Biophys Res Commun* **316**: 323-31.
- Tang, X., Marciano, D. L., Leeman, S. E. et Amar, S.** 2005. LPS induces the interaction of a transcription factor, LPS-induced TNF-alpha factor, and STAT6(B) with effects on multiple cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 5132-7.
- Tepass, U., Fessler, L. I., Aziz, A. et Hartenstein, V.** 1994. Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development* **120**: 1829-37.
- Teusch, N., Lombardo, E., Eddleston, J. et Knaus, U. G.** 2004. The low molecular weight GTPase RhoA and atypical protein kinase Czeta are required for TLR2-mediated gene transcription. *J Immunol* **173**: 507-14.
- Thanassi, D. G. et Hultgren, S. J.** 2000. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Current Opinion in Cell Biology* **12**: 420-430.
- Therrien, M., Morrison, D. K., Wong, A. M. et Rubin, G. M.** 2000. A genetic screen for modifiers of a kinase suppressor of Ras-dependent rough eye phenotype in *Drosophila*. *Genetics* **156**: 1231-42.
- Thrasher, A. J.** 2002. WASp in immune-system organization and function. *Nat Rev Immunol* **2**: 635-46.
- Tirouvanziam, R., Davidson, C. J., Lipsick, J. S. et Herzenberg, L. A.** 2004. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) of *Drosophila* hemocytes reveals important functional similarities to mammalian leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2912-7.
- Toussaint, B., Delic-Attree, I. et Vignais, P. M.** 1993. *Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the algD promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **196**: 416-421.
- Tsuda, M., Makino, Y., Iwahara, T., Nishihara, H., Sawa, H., Nagashima, K., Hanafusa, H. et Tanaka, S.** 2004. Crk associates with ERM proteins and promotes cell motility toward hyaluronic acid. *J Biol Chem* **279**: 46843-50.
- Tzou, P., Ohresser, S., Ferrandon, D., Capovilla, M., Reichhart, J. M., Lemaitre, B., Hoffmann, J. A. et Imler, J. L.** 2000. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity* **13**: 737-48.

V

- Valente, E., Assis, M. C., Alvim, I. M., Pereira, G. M. et Plotkowski, M. C.** 2000. *Pseudomonas aeruginosa* induces apoptosis in human endothelial cells. *Microb Pathog* **29**: 345-56.
- Vallet, I., Diggle, S. P., Stacey, R. E., Camara, M., Ventre, I., Lory, S., Lazdunski, A., Williams, P. et Filloux, A.** 2004. Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: fimbrial cup gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT. *J Bacteriol* **186**: 2880-90.
- Vallis, A. J., Yahr, T. L., Barbieri, J. T. et Frank, D. W.** 1999. Regulation of ExoS production and secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions. *Infect Immun* **67**: 914-20.
- Van Delden, C. et Iglewski, B. H.** 1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* **4**: 551-60.
- Vidal, S., Khush, R. S., Leulier, F., Tzou, P., Nakamura, M. et Lemaitre, B.** 2001. Mutations in the *Drosophila* dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKKs in the control of rel/NF-kappaB-dependent innate immune responses. *Genes Dev* **15**: 1900-12.
- Vierstraete, E., Cerstiaens, A., Baggerman, G., Van Den Bergh, G., De Loof, A. et Schoofs, L.** 2003. Proteomics in *Drosophila melanogaster*: first 2D database of larval hemolymph proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **304**: 831-8.
- Vierstraete, E., Verleyen, P., Baggerman, G., D'hertog, W., Van Den Bergh, G., Arckens, L., De Loof, A. et Schoofs, L.** 2004. A proteomic approach for the analysis of instantly released wound and immune proteins in *Drosophila melanogaster* hemolymph. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 470-5.

Vincent, T. S., Fraylick, J. E., McGuffie, E. M. et Olson, J. C. 1999. ADP-ribosylation of oncogenic Ras proteins by *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S in vivo. *Mol Microbiol* **32**: 1054-64.

Vodovar, N., Acosta, C., Lemaitre, B. et Boccard, F. 2004. *Drosophila*: a polyvalent model to decipher host-pathogen interactions. *Trends Microbiol* **12**: 235-42.

Vodovar, N., Vinals, M., Liehl, P., Basset, A., Degrouard, J., Spellman, P., Boccard, F. et Lemaitre, B. 2005. *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11414-9.

Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M. L., Lazdunski, A., Wu, L. F. et Filloux, A. 2001. Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *Embo J* **20**: 6735-41.

W

Wang, M. C., Bohmann, D. et Jasper, H. 2003. JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *Dev Cell* **5**: 811-6.

Weber, A. N., Tauszig-Delamasure, S., Hoffmann, J. A., Lelievre, E., Gascan, H., Ray, K. P., Morse, M. A., Imler, J. L. et Gay, N. J. 2003. Binding of the *Drosophila* cytokine Spatzle to Toll is direct and establishes signaling. *Nat Immunol* **4**: 794-800.

Wells, C. M., Walmsley, M., Ooi, S., Tybulewicz, V. et Ridley, A. J. 2004. Rac1-deficient macrophages exhibit defects in cell spreading and membrane ruffling but not migration. *J Cell Sci* **117**: 1259-68.

Wennerberg, K. et Der, C. J. 2004. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* **117**: 1301-12.

Werner, E. 2004. GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *J Cell Sci* **117**: 143-53.

Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H. et Hultmark, D. 2000. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13772-7.

Wick, M. J., Frank, D. W., Storey, D. G. et Iglewski, B. H. 1990. Structure, function, and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Annu Rev Microbiol* **44**: 335-63.

Williams, D. A., Tao, W., Yang, F., Kim, C., Gu, Y., Mansfield, P., Levine, J. E., Petryniak, B., Derrow, C. W., Harris, C., Jia, B., Zheng, Y., Ambruso, D. R., Lowe, J. B., Atkinson, S. J., Dinauer, M. C. et Boxer, L. 2000. Dominant negative mutation of the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, is associated with a human phagocyte immunodeficiency. *Blood* **96**: 1646-54.

Woolner, S., Jacinto, A. et Martin, P. 2005. The small GTPase Rac plays multiple roles in epithelial sheet fusion--dynamic studies of *Drosophila* dorsal closure. *Dev Biol* **282**: 163-73.

Wu, D. 2005. Signaling mechanisms for regulation of chemotaxis. *Cell Res* **15**: 52-6.

Wu, L. P., Choe, K. M., Lu, Y. et Anderson, K. V. 2001. *Drosophila* immunity: genes on the third chromosome required for the response to bacterial infection. *Genetics* **159**: 189-99.

Wurtele, M., Renault, L., Barbieri, J. T., Wittinghofer, A. et Wolf, E. 2001. Structure of the ExoS GTPase activating domain. *FEBS Lett* **491**: 26-9.

Y

Yahr, T. L., Hovey, A. K., Kulich, S. M. et Frank, D. W. 1995. Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S structural gene. *J Bacteriol* **177**: 1169-78.

Yahr, T. L., Goranson, J. et Frank, D. W. 1996. Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. *Mol Microbiol* **22**: 991-1003.

Yahr, T. L., Vallis, A. J., Hancock, M. K., Barbieri, J. T. et Frank, D. W. 1998. ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13899-904.

Yamauchi, A., Kim, C., Li, S., Marchal, C. C., Towe, J., Atkinson, S. J. et Dinanuer, M. C. 2004. Rac2-deficient murine macrophages have selective defects in superoxide production and phagocytosis of opsonized particles. *J Immunol* **173**: 5971-9.

Yamauchi, A., Marchal, C. C., Molitoris, J., Pech, N., Knaus, U., Towe, J., Atkinson, S. J. et Dinanuer, M. C. 2005. Rac GTPase isoform-specific regulation of NADPH oxidase and chemotaxis in murine neutrophils in vivo. Role of the C-terminal polybasic domain. *J Biol Chem* **280**: 953-64.

Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E. et Mizuno, K. 1998. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* **393**: 809-12.

Z

Zambon, R. A., Nandakumar, M., Vakharia, V. N. et Wu, L. P. 2005. The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 7257-62.

Zettervall, C. J., Anderl, I., Williams, M. J., Palmer, R., Kurucz, E., Ando, I. et Hultmark, D. 2004. A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 14192-7.

Zhang, L., Wang, H., Liu, D., Liddington, R. et Fu, H. 1997. Raf-1 kinase and exoenzyme S interact with 14-3-3zeta through a common site involving lysine 49. *J Biol Chem* **272**: 13717-24.

Zhao, X., Carnevale, K. A. et Cathcart, M. K. 2003. Human monocytes use Rac1, not Rac2, in the NADPH oxidase complex. *J Biol Chem* **278**: 40788-92.

Zhou, R., Silverman, N., Hong, M., Liao, D. S., Chung, Y., Chen, Z. J. et Maniatis, T. 2005. The role of ubiquitination in *Drosophila* innate immunity. *J Biol Chem* **280**: 34048-55.

Zhuang, Z. H., Zhou, Y., Yu, M. C., Silverman, N. et Ge, B. X. 2005. Regulation of *Drosophila* p38 activation by specific MAP2 kinase and MAP3 kinase in response to different stimuli. *Cell Signal* **18**: 441-8.

ANNEXE

Avet-Rochex A., Bergeret E., Attree I., Meister M. and Fauvarque M-O. 2005

Suppression of *Drosophila* cellular immunity by directed expression of the ExoS toxin GAP domain of *Pseudomonas aeruginosa*.

Cell. microbiology 7:799-810.

Résumé

L'exoenzyme S, une toxine de type III, de *Pseudomonas aeruginosa* possède un domaine GAP (GTPase Activating Protein) (ExoSGAP) inhibant les Rho GTPases (Rho, Rac, Cdc42) et la phagocytose dans les cellules de Mammifères en culture. J'ai utilisé une approche de transgénèse chez *Drosophila melanogaster* en utilisant un système d'expression tissu-spécifique inducible (UAS-Gal4) afin d'exprimer ExoSGAP. Nous avons montré qu'ExoSGAP cible *in vivo* les Rho GTPases Rho, Rac1, Rac2 et Cdc42. ExoSGAP affecte la résistance des mouches aux infections en inhibant la phagocytose des bactéries par les plasmatocytes, des cellules de type macrophage, mais n'a pas d'effet sur les voies NF- κ B. Une approche génétique a permis d'identifier de nouvelles cibles de la toxine, en recherchant des gènes dont la dérégulation modifie le phénotype d'œil ou d'aile induit par l'expression d'ExoSGAP. Nous avons identifié plusieurs gènes pouvant avoir un rôle dans les voies des JNK et NF- κ B. Ces résultats valident une stratégie d'étude des toxines de type III par transgénèse chez la drosophile.

J'ai parallèlement montré la spécificité de la GTPase Rac2 dans la résistance des mouches aux infections bactériennes. Rac2 participe notamment à la phagocytose.

Les travaux du Dr. H. Tricoire ont permis d'identifier 180 gènes dont la dérégulation modifie la réponse des mouches à un stress oxydant. J'ai testé 105 de ces lignées pour leur résistance aux infections, afin d'étudier une corrélation possible entre la réponse aux stress oxydant et infectieux. Ce crible a permis de montrer l'implication d'une protéine à domaine lectine PSLR (Pseudomonas Sensitive Lectin Receptor) dans la réponse immunitaire de la drosophile.

Mots-clés : réponse immunitaire innée, Rho GTPases, phagocytose, NF- κ B, *Drosophila melanogaster*, *Pseudomonas aeruginosa*, système de sécrétion de type III, Exoenzyme S.

Summary

The type III exoenzyme S toxin of *Pseudomonas aeruginosa* possesses a GAP domain (GTPase Activating Protein) (ExoSGAP) inhibiting the Rho GTPases (Rho, Rac and Cdc42) and phagocytosis in Mammal cell lines. We have used a transgenesis approach in *Drosophila melanogaster* using a tissue-specific inducible expression system (UAS-Gal4) to express ExoSGAP. We have demonstrated that ExoSGAP targeted *in vivo* the Rho GTPases Rho, Rac1, Rac2 and Cdc42. The ExoSGAP expression affects fly resistance to infection by inhibiting phagocytosis of bacteria by plasmatocytes, a macrophage cell line, but has no effect on NF- κ B signalling pathways. A genetic approach has allowed the identification of new ExoSGAP targets by looking for genes whose misexpression modifies the eye or wing phenotype induced by the toxin expression. We have identified several genes which can be implicated in JNK and NF- κ B signalling pathways. All these results validate a new strategy to study type III toxins by transgenesis in *Drosophila*.

In parallel, I have demonstrated GTPase Rac2 specificity in *Drosophila* resistance to infection. Rac2 participates notably in phagocytosis.

The works of Dr. H. Tricoire led to the identification of 180 genes whose misexpression modifies fly response to oxidative stress. We have tested 105 of these lines for their resistance to infections to study a possible correlation between the oxidative and infectious stress response. This screen allows to demonstrate the implication of a protein with a lectin domain called PSLR (Pseudomonas Sensitive Lectin Receptor) in fly immunity.

Keywords : innate immune response, Rho GTPases, phagocytosis, NF- κ B, *Drosophila melanogaster*, *Pseudomonas aeruginosa*, Type III secretion system, Exoenzyme S.